



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VALÉRIA MIRANDA AVANZI

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS VIRAIS DO HIV E
IMUNOPATOLÓGICAS EM PACIENTES COINFECTADOS HCV/HIV

CURITIBA

2019

VALÉRIA MIRANDA AVANZI

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS VIRAIS DO HIV-1 E IMUNOPATOLÓGICAS
EM PACIENTES COINFECTADOS HCV/HIV-1

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Medicina Interna e Ciências da Saúde no curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^ª Dra. Sonia Mara Raboni

CURITIBA
2019

A946 Avanzi, Valéria Miranda
Avaliação das características virais do HIV-1 e
imunopatológicas em pacientes coinfectados HCV/HIV-1 [recurso
eletrônico] / Valéria Miranda Avanzi. – Curitiba, 2019.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em
Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Sonia Mara Raboni

1. Infecção por HIV. 2. Hepacivírus. 3. Hepatite viral humana.
I. Raboni, Sonia Mara. II. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade
Federal do Paraná. III. Título.

NLM: WC 503



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **VALÉRIA MIRANDA AVANZI** intitulada: **AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS VIRAIS DO HIV E IMUNOPATÓLOGICAS EM PACIENTES COINFECTADOS HCV/HIV**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 11 de Fevereiro de 2019.

SONIA MARA RABONI
Presidente da Banca Examinadora

FELIPE FRANCISCO BONDAN TUON
Avaliador Interno (PUC/PR)

SÉRGIO MONTEIRO DE ALMEIDA
Avaliador Interno (UFPR)

GUILHERME FERREIRA SILVEIRA
Avaliador Externo (FIOCRUZ)

MERI BORDIGNON ROGUEIRA
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho aos meus pais, Donizete e Nenza e ao meu irmão Raul pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao término desta tese, agradeço primeiramente a Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

À minha família, em especial aos meus pais Donizete e Nenza, meu irmão Raul, pelas orações, conselhos e pela confiança depositada em mim.

A minha orientadora, professora Dra. Sonia Mara Raboni, pela confiança, dedicação, competência e profissionalismo, essenciais para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos médicos do Ambulatório de Coinfecção e Hepatites Virais do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), principalmente ao Dr. Felipe Tuon pela ajuda durante a seleção dos participantes do estudo.

Aos funcionários e colegas do Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas, pela acolhida e por todos os ensinamentos.

Ao Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ - Curitiba-PR, principalmente ao Juliano Bordignon e Guilherme Ferreira.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná pela realização dos sequenciamentos nucleotídicos.

A Unidad de Infección Viral e Inmunidad, do Instituto de Salud Carlos III, em especial ao Dr. Salvador Resino Garcia, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, posso dizer que foram meses de intenso aprendizado, que permitiram que eu tivesse contato com um centro de excelência em pesquisa. Agradeço também os pesquisadores do grupo pelo conhecimento compartilhado.

Às amigas que fiz ao longo desse caminho, por tornarem esta trajetória mais leve.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por conceder a bolsa de estudo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por conceder auxílio financeiro para a execução da pesquisa.

E a todos que de alguma forma colaboraram com a execução deste trabalho, muito obrigada!

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

As infecções pelo HIV-1 e hepatites virais são as principais causas de doenças crônicas no mundo e apresentam algumas semelhanças em relação às vias de transmissão. Além disso, a resposta ao tratamento é influenciada por múltiplos fatores virais e do hospedeiro. O desenvolvimento de doença hepática é variável entre indivíduos com fatores de risco semelhantes, sugerindo que a intensidade do processo inflamatório é um importante contribuinte. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi de compreender as características virais do HIV-1 e da imunopatogênese da coinfeção HCV/HIV-1. Para isto, foram avaliadas características epidemiológicas, clínicas, genéticas e virológicas em pacientes coinfectados com HCV/HIV-1 dos Ambulatórios de Infectologia e de Coinfeção e Hepatites Virais do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR). Este trabalho foi dividido em três estudos, sendo que, no primeiro, avaliou-se 30 indivíduos coinfectados com HCV/HIV-1, onde realizou-se a subtipagem dos genes *pol* e/ou *env* do HIV-1, 47,4% (n = 18) dos pacientes foram identificados como C; 31,6% (n = 12) subtipo B e 21% (n = 8) como formas recombinantes (CRFs); 61,1% (n=20) dos pacientes HCV/HIV-1 realizaram tratamento para o HCV com interferon- α peguilado em combinação com ribavirina. A avaliação do polimorfismo do gene da IL28B rs12979860, mostrou a presença do genótipo favorável C/C para o desenvolvimento da resposta virológica sustentada (RVS) em 50% (n=20) dos pacientes tratados para o HCV. No segundo estudo, avaliou-se um total de 37 pacientes mono infectados com HCV e 41 coinfectados com HCV/HIV-1, destes, 3 (7%) coinfectados foram a óbito, dois devido a complicações hepáticas; 23 (56,1%) realizaram tratamento interferon- α peguilado em combinação com ribavirina e 12 (52,1%) tratados apresentaram RVS. Em relação à anemia induzida pela ribavirina, todos os pacientes tratados (n = 23) apresentaram o SNP do gene da ITPA favorável para esse evento, e anemia esteve presente em 38,5% dos mono infectados e em 65,2% dos coinfectados. No terceiro trabalho, foram avaliados um total de 30 indivíduos com mono infecção por HCV, 37 coinfectados com HCV/HIV-1, 38 infectados pelo HIV-1 e 11 controles saudáveis. Comparando-se os grupos, os pacientes infectados pelo HCV (mono e coinfectados pelo HIV-1) apresentaram índices mais elevados de IL-8 no plasma em comparação aos infectados pelo HIV-1 (p= 0,0075 e p= 0,0004, respectivamente). Índices maiores de IP-10 foram encontrados em pacientes mono infectados pelo HCV (940,8 pg/mL; IQR 703,5 - 1508,0 pg/mL) em comparação com pacientes infectados pelo HIV-1 (p = 0,0011) e, podem sugerir, como já identificado em outros estudos, que os pacientes com HCV apresentam maior predisposição a ativar o sistema imune. Com a disponibilidade de antivirais de ação direta (DAAs) para o tratamento da infecção crônica pelo vírus da hepatite C, regimes livres de interferon têm sido implementados em todo o mundo. No entanto, no cenário da coinfeção HCV/HIV-1, a ribavirina continuará a compor alguns esquemas terapêuticos, portanto avaliar o risco de toxicidade poderá auxiliar no monitoramento dos pacientes. Compreender os mecanismos fisiopatológicos de ambas as infecções possibilitará sua comparação com outras infecções virais que atingem o fígado, para os quais ainda não são disponibilizadas terapias eficazes.

Palavras-chave: Coinfeção. IL28B. ITPA. Marcadores Inflamatórios.

HIV-1 infections and viral hepatitis are the main causes of chronic diseases in the world and have some similarities with regard to the transmission routes. In addition, the response to treatment is influenced by multiple viral and host factors. The development of liver disease is variable among individuals with similar risk factors, suggesting that the intensity of the inflammatory process is an important contributor. Thus, the objective of this work was to understand the viral characteristics of HIV-1 and the immunopathogenesis of HCV / HIV-1 coinfection. For this, epidemiological, clinical, genetic and virological characteristics were evaluated in patients coinfecting with HCV / HIV-1 of the Infectology and Coinfection and Viral Hepatitis of Clinics Hospital of the Federal University of Paraná (HC-UFPR). This study was divided into three studies. In the first one, 30 HCV / HIV-1 coinfecting individuals were evaluated, where the pol and / or env subtyping was performed, 47.4% (n = 18) of the patients were identified as C; 31.6% (n = 12) subtype B and 21% (n = 8) as recombinant forms (CRFs); 61.1% (n = 20) of HCV / HIV-1 patients were treated for HCV with pegylated interferon- α in combination with ribavirin. The evaluation of the IL28B gene polymorphism rs12979860, showed the presence of the favorable C / C genotype for the development of sustained virological response (SVR) in 50% (n = 20) of patients treated for HCV. In the second study, a total of 37 monoinfected patients with HCV and 41 coinfecting with HCV / HIV-1 were evaluated. Of these, 3 (7%) coinfecting died, two due to hepatic complications; 23 (56.1%) underwent pegylated interferon- α therapy in combination with ribavirin and 12 (52.1%) treated presented SVR. Regarding ribavirin-induced anemia, all patients had ITPA gene SNP favorable for this event, and anemia was present in 38.5% of monoinfected and 65.2% of coinfecting patients. In the third study, a total of 30 individuals with HCV mono-infection, 37 HCV / HIV-1 coinfecting, 38 HIV-1 infected and 11 healthy controls were evaluated. Comparing the groups, patients infected with HCV (mono and HIV-1 coinfecting) had higher rates of plasma IL-8 compared to those infected with HIV-1 ($p = 0.0075$ and $p = 0.0004$, respectively). The highest IP-10 levels were found in HCV-infected mono patients (940.8 pg / mL; IQR 703.5 - 1508.0 pg / mL) compared to HIV-1-infected patients ($p = 0.0011$) may suggest, as already identified in other studies, that HCV patients are more likely to activate the immune system. With the availability of direct-acting antivirals (DAAs) for the treatment of chronic hepatitis C virus infection, interferon-free regimens have been implemented worldwide. However, in the scenario of HIV-1 / HCV coinfection, ribavirin will continue to compose some therapeutic regimens, so evaluating the risk of toxicity may help in the monitoring of patients. Understanding the pathophysiological mechanisms of both infections will make it possible to compare them with other viral infections that reach the liver, for which effective therapies are not yet available.

Key words: Coinfection. IL28B. ITPA. Inflammatory Markers.

FIGURA 1-AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE DELEÇÃO DE 32PB NO GENE CC5 EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1	39
FIGURA 2-AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO RS12979860 DO GENE DA IL28B	39
FIGURA 3- ATIVIDADE DA ENZIMA ITPASE	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-INICIADORES UTILIZADOS PARA AS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES DOS GENES ENV E POL DO HIV-1	34
TABELA 2 - INICIADORES UTILIZADOS PARA AS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES DOS GENES HUMANOS DO CCR5 E IL28B.	38

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Aids	- Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALT	- Alanina aminotransferase
Anti-HCV	- Anticorpo contra o vírus da hepatite C
APRI	- <i>AST to platelet ratio index</i>
AST	- Aspartato aminotransferase
ATP	- Trifosfato de adenosina
CAAE	- Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CBA	- Cytometric Bead Array
CCR5	- C-C receptor quimiocina tipo 5
CCR5-Δ32	- C-C receptor quimiocina tipo 5 delta 32
CD	- Célula dendrítica
CD38	- <i>Cluster of differentiation 38</i>
CD4	- <i>Cluster of differentiation 4</i>
CD8	- <i>Cluster of differentiation 8</i>
cDNA	- Ácido Desoxirribonucleico Complementar
cels/mL	- Células por mililitro
CEP-HC-UFPR	- Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
CHC	- Carcinoma hepatocelular
CK	- Célula de Kupffer
CPR	- <i>Calibrated Population Resistance</i>
CRF	- Formas recombinantes circulantes
CV	- Carga viral
CXCR1	- <i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 1</i>
CXCR2	- <i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 2</i>
CXCR4	- <i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 4</i>
DAA	- Antiviral de ação direta
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
E1	- Glicoproteína do envelope 1
E2	- Glicoproteína do envelope 2
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético

<i>env</i>	- Gene que codifica as proteínas do envoltório
EPO	- Eritropoietina
F	- Fibrose
FIB4	- <i>Fibrosis 4</i>
FPR	- <i>Falso Positive Rate</i>
G	- Genótipo
g	- Gravidade
g/dL	- Grama por decilitro
<i>gag</i>	- Gene que codifica as proteínas estruturais internas
GWAS	- Estudos de Associação Genômica Ampla
Hb	- Hemoglobina
HC-UFPR	- Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HCV	- Vírus da hepatite C
HIV-1	- Vírus da imunodeficiência humana
ICC	- Instituto Carlos Chagas
IFN	- Interferon
IFN- α	- Interferon alfa
IFN- γ	- Interferon gama
IFN- λ	- Interferon lambda
IFN1	- Interferon tipo 1
IFN2	- Interferon tipo 2
IFN3	- Interferon tipo 3
IL-2	- Interleucina 2
Il-6	- Inerleucina 6
IL-8	- Interleucina 8
IL28A	- Interleucina 28A
IL28B	- Interleucina 28B
IL29	- Interleucina 29
IMP	- Monofosfato de inosina
IP-10	- Quimiciocina 10
ISG	- Genes estimulados por Interferon
ITP	- Trifosfato de inosina
ITPA	- Enzima inosina trifosfato pirofosfatase

ITPase	- Inosina trifosfato pirofosfatase
Kb	- Kilobase
LANL	- <i>Los Alamos National Laboratory HIV Database</i>
LTR	- <i>Long Terminal Repeats</i>
MGB	- <i>minor groove binder</i>
MgCl ₂	- Cloreto de magnésio
mL	- Mililitro
ML	- <i>Maximum Likelihood</i>
mM	- Milimolar
nef	- Proteína de efeito negativo
Nested- PCR	- Reação em cadeia da polimerase <i>nested</i>
NFQ	- <i>quencher</i> não fluorescente
NK	- <i>Natural Killer</i>
nm	- Nanômetro
NS2	- Proteína não estrutural 2
NS3	- Proteína não estrutural 3
NS4A	- Proteína não estrutural 4A
NS5	- Proteína não estrutural 5
NS5B	- Proteína não estrutural 5B
°C	- Grau Celsius
OMS	- Organização Mundial de Saúde
pb	- Pares de base
PBS	- Solução Salina Fosfatada Tamponada
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PCR-CTPP	- <i>Polymerase Chain Reaction with Confronting Two Pair-Primers</i>
PCR-HCV	- Reação em cadeia da polimerase para o vírus da hepatite C
PE	- Ficoeritrina
Peg-IFN-α +	- Interferon alfa peguilado associado a ribavirina
RBV	
PIC	- Complexo pré-integração
pmol	- Picomol
<i>pol</i>	- Gene que codifica as proteases, transcriptase reversa e integrase
Pol II	- Polimerase II

PR/TR	- Genes da protease/parte da transcriptase reversa
PVHA	- Pessoas vivendo com o HIV/aids
qPCR	- PCR em tempo real
RBV	- Ribavirina
RBV-TP	- Ribavirina trifosfato
<i>rev</i>	- Proteína reguladora da transcrição do gene viral
RIP	- <i>Recombinant Identification Program</i>
RNA	- Ácido ribonucleico
RNA _m	- Ácido ribonucleico mensageiro
RVS	- Resposta virológica sustentada
SNP	- Polimorfismo de nucleotídeo único
TARV	- Terapia antirretroviral
<i>tat</i>	- Proteína transativadora transcripcional
TBE	- Tris-borato EDTA
TCD4 ⁺	- Linfócito T auxiliar
TCD8 ⁺	- Linfócito T citotóxico
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th1	- Linfócito T auxiliar 1
Th2	- Linfócito T auxiliar 2
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa
UTR	- <i>Untranslated region</i>
vif	- Fator de infectividade do vírion
vpr	- Proteína viral r
vpu	- Proteína viral u
μ L	- Microlitro
μ M	- Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.2 OBJETIVOS	16
1.2.1 Objetivo Geral	16
1.2.2 Objetivos Específicos	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 COINFECÇÃO HCV/HIV	17
2.2 ASPECTOS GERAIS DO VÍRUS DA HEPATITE C	19
2.3 ASPECTOS GERAIS DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA	25
2.4 IMUNOPATOGENESE DA INFECÇÃO PELO HCV E HIV-1	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	32
3.2 ASPECTOS ÉTICOS	32
3.3 CASUÍSTICA.....	32
3.4 MÉTODOS.....	33
3.4.1 Obtenção do concentrado de leucócitos (buffy coat)	33
3.4.2 Extração do DNA	33
3.4.3 Métodos utilizados para análise das características virais do HIV-1	34
3.4.4 Métodos utilizados para análise das características do co-receptor CCR5 e polimorfismo dos genes da IL28B e da ITPA do hospedeiro.....	37
3.4.5 Métodos utilizados para análise das quimiocinas IL-8 e IP-10	41
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4 RESULTADOS.....	43
4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES COINFECTADOS COM HIV-1.....	43
4.2 PERFIL DOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPS) DA IL28B E ITPA NOS PACIENTES MONOINFECTADOS COM HCV E COINFECTADOS COM HCV/HIV-1	51
4.3 DOSAGEM DA INTERLEUCINA-8 (CXCL8/IL-8) E DA QUIMIOCINA 10 INDUZIDA POR INTERFERON- γ (CXCL10/P-10) COMO MARCADORES PARA AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO DA INFECÇÃO PELO HCV E HCV/HIV-1 E MONITORAMENTO DA RESPOSTA AO TRATAMENTO (Artigo submetido para a revista <i>Infection and Immunity</i>).....	56

5 CONCLUSÃO	75
6 PERSPECTIVAS DO ESTUDO	76
7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	77
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICE	93

1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) representa um importante problema de saúde pública mundial com mais de 71 milhões de pessoas cronicamente infectadas (WHO, 2017). A coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) é observada com frequência significativa, uma vez que estes vírus compartilham mecanismos similares de transmissão, estimando-se que aproximadamente 3 milhões de pessoas estejam cronicamente coinfectadas pelo HCV e HIV-1 (BERENGUER et al., 2012a; WHO, 2016). Em diferentes serviços de saúde brasileiros, as taxas de prevalência obtidas para a coinfeção HCV/HIV-1 variam entre 9,2% e 54,7%, conforme distribuição geográfica e diferentes fatores de risco. As maiores taxas de prevalência foram observadas entre usuários de drogas injetáveis, apontando-os como o grupo de risco mais importante para aquisição concomitante de ambas as infecções (BRASIL, 2017a; MARTINS et al., 2011).

A infecção pelo HIV-1 representa impacto negativo na história natural da infecção pelo HCV em múltiplos aspectos, uma vez que está associada à viremia persistente pelo HCV e a cargas virais mais elevadas que a média observada para pacientes monoinfectados pelo HCV. Além disso, a infecção pelo HIV-1 representa um aumento do risco de evolução para a forma crônica da infecção pelo HCV, pois cerca de 90% dos indivíduos HIV-1 positivos desenvolvem doença crônica após infecção aguda pelo HCV, enquanto mais de 30% dos pacientes monoinfectados pelo HCV apresentam resolução espontânea da infecção aguda (SINGAL e ANAND, 2009; SULKOWSKI et al., 2000).

Múltiplos fatores têm sido associados à variabilidade de respostas clínicas aos antivirais específicos para o tratamento do HCV, entre estes são citados os fatores virais e aos relacionados ao hospedeiro. Demonstrou-se que fatores genéticos do hospedeiro, dentre eles, o SNP (Single Nucleotide Polymorphism) do gene da interleucina 28B (IL28B) no cromossomo 19 e do gene que codifica a enzima inosina-trifostatase (ITPA) no cromossomo 20, estão associados com a resposta virológica sustentada (RVS) ao interferon e com a proteção contra a anemia induzida pela ribavirina (RBV), respectivamente (THOMAS et al., 2009; FELLAY et al., 2010). Além disso, alguns fatores imunológicos podem influenciar na resposta ao tratamento, uma vez que os efeitos protetores do sistema imunológico presente em pacientes monoinfectados com o HCV são perdidos ou alterados com a desregulação da resposta imune em pacientes coinfectados com HCV/HIV-1 (KIM; CHUNG, 2009; LAMBOTIN et al., 2012). O perfil de algumas citocinas, como a IL-8 e a IP-10, desempenha um papel importante na

resposta ao tratamento com interferon- α peguilado e ribavirina, além da modulação da resposta imune contra o HCV, direcionando-a para um padrão em que predominará a resposta estimulada por linfócitos T-auxiliares do tipo 1 (Th1) ou do tipo 2 (Th2) (JACOBSON BROWN; NEUMAN, 2001).

No entanto, há poucos dados sobre os níveis plasmáticos de citocinas em pacientes coinfectados pelo HCV/HIV-1 em terapia antiviral para HCV, bem como sua resposta ao tratamento, principalmente em pacientes brasileiros. Esse é o primeiro estudo a identificar e avaliar um grupo de indivíduos coinfectados com HCV/HIV-1 no Estado do Paraná, e os resultados obtidos poderão contribuir para melhor compreensão dos aspectos fisiopatológicos da coinfecção nesse grupo de pacientes.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- Descrever as características virais do HIV-1 e da imunopatogênese da coinfecção HCV/HIV-1.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Descrever os subtipos de HIV-1 encontrados no grupo de pacientes coinfectados HCV/HIV-1.
- Comparar os genótipos encontrados no *locus* da IL28B do cromossomo 19 com a resposta ao tratamento com Peg-IFN- α + RBV nos pacientes coinfectados HCV-HIV-1.
- Comparar os genótipos encontrados no *locus* da ITPA do cromossomo 20 com a presença de anemia induzida pela RBV nos pacientes coinfectados HCV-HIV-1.
- Avaliar a dosagem plasmática de IL-8 e IP-10 nos pacientes coinfectados com HIV-1.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COINFECÇÃO HCV/HIV-1

Durante anos, a hepatite C crônica tem sido uma das principais causas de morte no grupo de pacientes coinfectados com HCV/HIV-1 (PILCHER et al., 2004; LÓPEZ-DIÉGUEZ et al., 2011). Sabe-se que a história natural da infecção do HIV-1 e HCV é significativamente alterada pela coexistência de ambos os vírus, com uma progressão mais rápida para a aids e para estágios avançados da doença hepática, como a cirrose, uma vez que o HCV é reconhecido pelo sistema imunológico, entretanto, em pacientes coinfectados com o HIV-1, além das estratégias de evasão do próprio vírus, é adicionado o dano ao sistema imunológico causado pelo HIV-1. Isso reflete em menores taxas de eliminação espontânea do HCV, maiores complicações, razão pela qual a doença hepática é a principal causa de morte não relacionada à aids em pessoas infectadas com o HIV-1 (TERILLI; COX, 2013).

A coinfecção HCV/HIV-1 é um problema de saúde devido ao alto risco de morbidade e mortalidade, entretanto com os recentes avanços no tratamento do HCV, a expectativa de vida nessa população mudou radicalmente. O tratamento eficaz com as novas drogas antivirais de ação direta (DAA – do inglês *direct-acting antiviral*) não só reduziu a mortalidade geral relacionada com aids nesta população de doentes, como também abrandou a progressão da doença hepática, uma vez que as taxas de resposta virológica sustentada (RVS) com os novos tratamentos em pacientes coinfectados com HCV/HIV-1 atingem valores semelhantes aos dos pacientes HCV monoinfectados (COTTE et al., 2016; HAWKINS et al., 2016).

A fibrose hepática progride mais rápido em pacientes coinfectados com HCV/HIV-1 do que em pacientes monoinfectados pelo HCV, isto ocorre devido à desregulação do sistema imune e de outras vias metabólicas que conduzem a toxicidade hepática e síndromes metabólicas, como esteatose e resistência à insulina (GRAHAM et al., 2001). Uma vez que os efeitos adversos da TARV *versus* HIV-1 durante a coinfecção HCV/HIV-1 desempenham um papel um papel importante no desenvolvimento de distúrbios metabólicos, como resistência a insulina, dislipidemia e/ou esteatose hepática não alcoólica (RYAN et al., 2009).

A imunopatogênese do HIV-1 resulta na depleção maciça de células T CD4 + do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), levando a um epitélio alterado e aumento da translocação microbiana, em particular o lipopolissacarídeo (LPS) que entra na corrente sanguínea e se correlaciona com a progressão fibrose hepática (BRENCHLEY et al., 2006). O LPS, por sua vez, aumenta os níveis do marcador de ativação de macrófagos sCD14,

considerados marcadores de inflamação e associados a um risco aumentado de mortalidade em pacientes com HIV-1 (SANDLER et al., 2011). Em biópsias de indivíduos coinfectados com HCV/HIV-1, foi encontrada uma correlação entre níveis aumentados de LPS e outros marcadores associados à progressão da doença hepática (BALAGOPAL et al., 2008).

Os efeitos protetores do sistema imune inato presentes na monoinfecção do HCV são perdidos ou alterados com a desregulação imunológica produzida pelo HIV-1. A capacidade de infecção pelo HIV-1 nos hepatócitos também desempenha um papel crítico na progressão da doença hepática em pacientes coinfectados com HCV/HIV-1, uma vez que macrófagos residentes no fígado podem ser infectados pelo HIV-1. Na coinfecção HCV/HIV-1, as células de Kupffer (CKs) deslocam a resposta imunitária de Th1 para Th2, apresentando receptores CD4, que serão alvos para a glicoproteína gp120 do HIV-1 (ROTMAN; LIANG, 2009). Na presença do HIV-1, ocorre um aumento na ativação das células *Natural Killer* (NK), porém com diminuição da expressão dos receptores NK e diminuição da secreção de citocinas, o que provoca uma alteração de sua função, diminuindo sua atividade citotóxica (IANNELLO et al., 2008; TERILLI; COX, 2013). O HIV-1 infecta células dendríticas (CD) e reduz o seu número, o que pode contribuir para uma resposta imunológica deficiente em pacientes coinfectados com HCV/HIV-1 (LAMBOTIN et al., 2010).

Assim como na imunidade inata, a coinfecção por HIV-1 altera a resposta do sistema imune adaptativo ao HCV (TERILLI; COX, 2013). Uma característica da monoinfecção com o HIV-1 é o esgotamento de células TCD4+, culminando na imunossupressão, o que implica em um efeito prejudicial sobre a geração de anticorpos neutralizantes específicos de HCV e a perda da imunidade contra o HCV gerado anteriormente (KIM; CHUNG, 2009; NETSKI et al., 2007). Esta diminuição na produção de anticorpos pode ser devido ao fato de que a infecção pelo HIV-1 induz a uma maior rotatividade (*turnover*) das células B, com diminuição de sua vida plasmática, pela presença de células B imaturas e redução de células B de memória (KIM; CHUNG, 2009).

Em relação à ativação imune de células T, os pacientes coinfectados com HCV/HIV-1 apresentam maiores porcentagens de CD4⁺/CD38⁺ e CD8⁺/CD38⁺ em relação a controles saudáveis e pacientes monoinfectados pelo HIV-1 (MEDRANO et al., 2018). A infecção pelo HCV pode aumentar a porcentagem de CD8⁺/CD38⁺ para níveis acima dos controles saudáveis com um retorno aos valores normais após a eliminação do HCV (MARKOWITZ et al., 2016; SHEN et al., 2010). Além disso, pacientes coinfectados pelo HCV/HIV-1 apresentam maior ativação imunológica do que pacientes monoinfectados pelo HIV-1 (SAJADI et al., 2012). Esta ativação imunológica pode acelerar o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (CHC)

(LIN et al., 2013; MÁRQUEZ et al., 2016), e tem sido associada à progressão da aids, aparecimento de comorbidades e óbito em pacientes infectados pelo HIV-1 (YOUNAS et al., 2016).

Os linfócitos TCD4⁺ reconhecem antígenos apresentados nas moléculas MHC de classe II presentes nas células apresentadoras de antígenos (APCs) e células TCD8⁺ em MHC de classe I. Subsequentemente linfócitos TCD4⁺ desempenham inúmeras funções efetoras, incluindo ativação direta de macrófagos e linfócitos B antígeno específicos, assim como a ativação de linfócitos TCD8⁺ dependentes de citocinas, e estas células tem efeito direto na eliminação de células infectadas por mecanismos citolíticos e não citolíticos (NEUMANN-HAEFELIN et al., 2005).

De uma maneira geral, as infecções pelo HIV-1 e HCV são, cada uma delas, caracterizadas por aumentos de vários marcadores plasmáticos (DEEKS et al., 2013; IPP et al., 2014; LEEANSYAH et al., 2013). Com terapia antirretroviral supressora, as concentrações plasmáticas dos marcadores inflamatórios tendem a diminuir, mas nem sempre se normalizam (FUNDERBURG et al., 2013).

2.2 ASPECTOS GERAIS DO VÍRUS DA HEPATITE C

A prevalência estimada dos indivíduos infectados com HCV em todo o mundo, com base na positividade dos anticorpos anti-HCV, é de 1,9%, correspondendo entre 130 e 150 milhões de pessoas. No entanto, seja por eliminação espontânea ou como resultado do tratamento, em torno de 71%, ou seja, 62,5-79,4 milhões de pessoas são virêmicas, ou seja são positivas para o RNA do HCV (GOWER et al., 2014).

O HCV é classificado dentro do gênero *Hepacivirus*, da família *Flaviviridae* (FARCI; PURCELL, 2000). Foi identificado no ano de 1989 como um dos principais causadores das hepatites, principalmente pela transmissão por transfusão sanguínea, que até a data, era identificado como hepatite não-A e não-B (CHOO et al., 1989; KUO et al., 1989). Trata-se de um vírus esférico, com um diâmetro de 55 nm e um envelope glicoproteico. Seu genoma codifica uma única poliproteína de 3.010 aminoácidos, que posteriormente é modificada para gerar proteínas estruturais e não-estruturais, sendo que 25% da poliproteína dá lugar as proteínas estruturais, que são as proteínas do nucleocapsídeo e do envelope, as demais, formam seis proteínas não-estruturais. O produto do gene C (nucleocapsídeo) é formado por uma proteína de 190 aminoácidos, a qual constitui a subunidade básica que forma o nucleocapsídeo.

Os genes E1 e E2 codificam as duas glicoproteínas do envelope do vírus: gp35 e gp70, que têm um papel fundamental na ligação aos receptores celulares e sua posterior fusão, propiciando a entrada do vírus nas células hospedeiras. Os genes não estruturais, NS2 e NS3, por sua vez, codificam duas proteases que intervêm no processamento de toda a região não estrutural do precursor da poliproteína. O produto da NS3 é uma helicase que atua desenrolando o modelo de RNA durante a replicação do genoma. O produto NS4A atua como um cofator de NS3. O produto da NS5B contém o domínio RNA-polimerase dependente do RNA essencial para a replicação viral. NS5 modula a resposta antiviral do hospedeiro mediada pelo interferon. A região de codificação termina em um único códon de parada, seguido de uma região 3' não traduzida (3'UTR) (PRINCE et al., 1992).

O HCV replica fundamentalmente nos hepatócitos (SUGANO et al., 1995), o genoma viral é detectado nas células de Kupffer (CKs) e nas células endoteliais hepáticas (BLIGHT et al., 1993). Porém, o vírus pode replicar em células mononucleares no sangue periférico, como nos linfócitos T e B, nas células polimorfonucleares, e em outros locais como nos linfonodos e células epiteliais do trato gastrointestinal e do cérebro (DEFORGES et al., 2004 e FORTON et al., 2004).

No processo de replicação viral o genoma do HCV não se integra ao núcleo celular, sendo que esta ocorre no citoplasma da célula hepática. Portanto, pode-se afirmar que o HCV não apresenta formas estáveis de infecção, ao contrário do HIV-1. A ausência de reservatórios estáveis do HCV facilita a erradicação total do vírus, desde que se utilizem os antivirais adequados. Essa circunstância peculiar, ou seja, que o HCV não é integrado no núcleo da célula durante sua replicação, confere uma de suas principais características: é a única infecção viral crônica que se pode erradicar com o tratamento (MAYLIN et al., 2009).

Geralmente as respostas imunes celular e humoral do hospedeiro durante a fase aguda e crônica da infecção pelo HCV são eficazes, entretanto, a alta variabilidade viral desempenha um papel fundamental na cronificação da infecção pelo HCV (KOBAYASHI et al., 1997). Por meio de análises filogenéticas com as sequências de nucleotídeos, o HCV foi dividido em 7 genótipos (G) que, por sua vez, compõem 67 subtipos confirmados, 20 atribuídos provisoriamente e 21 ainda não atribuídos, identificados com letras minúsculas. Os genótipos têm uma homologia de aproximadamente 66-69% entre si, enquanto subtipos de 77-80% (SMITH et al., 2014).

Os genótipos 1, 2 e 3 são responsáveis por 90% das infecções por HCV na Ásia, Caribe, Europa, América do Norte, América do Sul e Austrália; o genótipo 1b na maior parte da África do Sul, genótipo 6 no Sudeste Asiático e o genótipo 7 isolados de imigrantes africanos

no Canadá. Globalmente, G1 é predominante com 49,1% das infecções totais, seguido de G3 com 17,9%, G4 com 16,8%, G2 com 11%, G5 com 2%, G6 com um 1,4% e o G7 em conjunto com aqueles que não estão bem definidos somam 1,8% (THE POLARIS OBSERVATORY HCV, 2017; MESSINA et al., 2015; PETRUZZIELLO et al., 2016). No Brasil, os subtipos 1a e 3a do HCV são os mais prevalentes em relação ao subtipo 1b, sendo raros os casos de genótipos 2, 4 e 5 (LAMPE et al., 2013).

A fase aguda da infecção pelo HCV começa imediatamente após a infecção, geralmente é assintomática em até 6 meses, mas há algumas pessoas que apresentam sintomas, como astenia, náuseas, icterícia e colúria, isto ocorre antes da soroconversão. Clinicamente, um aumento em até dez vezes na concentração da alanina aminotransferase (ALT) é observado nas primeiras semanas. Além disso, geralmente os anticorpos contra o HCV são detectáveis em até 90 dias após a infecção. Por ser frequentemente assintomática e o período de soroconversão relativamente longo, o diagnóstico da infecção aguda é incomum (BRASIL, 2015). O RNA do HCV é detectado por técnicas de biologia molecular, a partir dos primeiros dias de infecção (MAHESHWARI et al., 2008).

A hepatite C crônica é definida como a persistência de detecção do RNA viral por mais de seis meses, sem possibilidade de resolução espontânea da viremia. Em muitos casos, permanece assintomática por 20 a 30 anos sem ser diagnosticada e é descoberta ao acaso (MYRMEL; ULVESTAD, 2009). O risco de lesão hepática aumenta quanto maior o tempo sem tratamento para HCV. O dano hepático é caracterizado por lesões inflamatórias, acompanhadas por acúmulo de lipídios (esteatose) e fibrose progressiva, podendo evoluir para cirrose, insuficiência hepática e CHC. A taxa de progressão da fibrose apresenta grande variabilidade entre os indivíduos, pois depende de cofatores, como o genótipo viral, os fatores genéticos do paciente, tempo de infecção, consumo de álcool, coinfeções e presença de esteatose hepática (ALFREDO, 1999; POYNARD et al., 2008).

Durante anos, a terapia imunomoduladora com interferon- α peguilado (Peg-IFN- α + RBV) em combinação com ribavirina (RBV) foi o único tratamento com alguma eficácia contra o HCV. A ribavirina, é um análogo de guanossina, que no hepatócito infectado é fosforilado pela ação sequencial de 3 quinases celulares, sendo que diferentes mecanismos de ação foram propostos: (1) Potencializa a resposta Th1 ao aumentar as citocinas, tais como IFN- γ , TNF- α e IL-2, que potencializam a lise de hepatócitos infectados e reduzem a replicação viral; (2) Inibe a enzima inosina desidrogenase monofosfato, essencial para transcrição viral e replicação de vírus de RNA; (3) Inibe a NS5B, embora este efeito seja ineficaz; (4) Atua como um

mutagênico, quando incorporado nos novos genomas sintetizados, ativando a apoptose (TAYLOR et al., 2004).

O tratamento da hepatite C é efetivo quando ocorre RVS, caracterizada pela ausência do RNA-HCV após 24 semanas do término do tratamento utilizando esquemas com Peg-IFN- α + RBV ou em 12 com as DAA (BRASIL, 2017b; MODI; LIANG, 2008; MUNIR et al., 2010). Pacientes com fibrose avançada (F3-4) ou cirrose compensada (F4) têm taxas menores de RVS, e mesmo que o elimine, pode manter o risco de desenvolver CHC, por isso a recomendação de acompanhamento dos pacientes com fibrose avançada. Quanto aos pacientes com cirrose descompensada, os primeiros resultados do uso de DAA mostraram uma melhoria ou estabilização da função hepática em 60% e, em alguns casos, até o desaparecimento da descompensação que pode levar a não necessidade de transplante hepático (10-30%) (EASL, 2016).

A taxa de RVS utilizando este esquema em pacientes com genótipo 1 e 4 era de aproximadamente 45% e, cerca de 80% em pacientes infectados com genótipos 2 e 3 (FELD; HOOFNAGLE, 2005; TORRIANI, et al., 2004; MARTINOT-PEIGNOUX et al., 2010). Além disso, quando havia a disponibilidade de terapia apenas com a associação de Peg-IFN- α + RBV, observava-se que a resposta ao tratamento estava associada a fatores virais e genéticos do hospedeiro. Na era dos tratamentos baseados em Peg-IFN- α + RBV, o conhecimento do genótipo foi o principal fator preditivo, mas atualmente, devido às terapias com DAA, o genótipo diminuiu seu poder preditivo. No entanto, a avaliação destes permite aumentar o conhecimento da patogênese desta infecção (THOMAS et al., 2009b).

Nos primeiros ensaios clínicos com Peg-IFN- α + RBV, a carga viral (CV) inicial acima de 800.000 UI/ml foi associada com uma chance de 9% menor de cura. Além disso, pacientes com altos níveis de CV possuíam 15% menos chances de atingir a RVS (MARTINOT-PEIGNOUX et al., 2007; ZEUZEM et al., 2009). Atualmente, devido ao uso das DAA, a CV possui pouco impacto sobre a probabilidade de alcançar a RVS, porém, deve ser realizada antes da administração da terapia para acompanhar a resposta ao tratamento (EASL, 2015).

Nos tratamentos com Peg-IFN- α + RBV a fibrose hepática também foi considerada um dos fatores com maior importância, uma vez que estágios mais avançados foram associados a uma menor taxa de RVS (FRIED; SHIFFMAN; REDDY, 2002; HADZIYANNIS, 2004; HOOFNAGLE et al., 2009; HSU et al., 2009; IDREES; RIAZUDDIN, 2009; MANNS et al., 2001; MCHUTCHISON et al., 1998; POYNARD et al., 1998, 2009; ROMERO-GÓMEZ et al., 2005).

A avaliação é feita de forma histológica da biópsia hepática, em uma combinação com as informações sobre a presença de fibrose e processo inflamatório e, para caracterizar a intensidade do avanço da fibrose hepática, utiliza-se um escore denominado escala METAVIRm(BEDOSSA; POYNARD, 1996). Essa classificação compreende o grau de atividade (nível de inflamação) ao qual é atribuído um número com base na intensidade das lesões inflamatórias em uma escala de 0-4, em que 0 indica ausência de atividade e 4 significa atividade intensa; e o estágio (nível de fibrose) com outra escala de 0-4, onde 0 = sem fibrose, 1 = fibrose portal sem septos (fibrose limitada ao trato portal), 2 = poucos septos (poucos tratos fibrosos emergindo da tríade portal), 3 = fibrose em pontes (tratos fibrosos portoportais ou porto-centrais) e 4 = cirrose (tratos fibrosos em nódulos de regeneração com alteração da arquitetura hepática) (TAKADA; JAMESON, 2009)

Na ausência de métodos como a biópsia hepática, utilizam-se os índices indiretos, como o APRI e FIB4. São métodos não invasivos que permitem identificar fibrose avançada e determinar o tratamento por meio de exames laboratoriais. Possuem boa reprodutibilidade, são fáceis de executar e têm baixo custo (BRASIL, 2017a). São validados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e permitem avaliar os graus de estágio da fibrose (WHO, 2014). Estes marcadores apresentam maior sensibilidade e confiabilidade quando utilizados juntos (PARISE, EDISON R.; STRAUSS, EDNA; CHEINQUER, 2014).

AST to platelet ratio index (APRI) é um método simples de elevada acurácia que consiste em relacionar os valores de aspartato aminotransferase (AST) com as plaquetas. Pode ser utilizado para monitorar os pacientes durante e após o tratamento (YILMAZ et al., 2011). A interpretação do grau de fibrose está relacionada a valores numéricos: valores $\leq 0,5$ (baixo corte) indicam que as chances de fibrose são reduzidas e valores $\geq 1,5$ (alto corte) indicam fibrose significativa (WAI et al., 2003). Já o *Fibrosis 4* (FIB4) avalia o grau de fibrose hepática. O teste foi desenvolvido inicialmente para ser utilizado em pacientes coinfectados pelo HCV/HIV-1, sendo posteriormente aceito para avaliar hepatite C (STERLING et al., 2006). Possui elevada sensibilidade como preditor da fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica. É calculado a partir da idade multiplicado pelo valor da AST e dividido pela contagem de plaquetas. Os valores $< 1,45$ significam ausência de fibrose e valores $> 3,25$ correspondem fibrose avançada (VALLET-PICHARD et al., 2007). Esses marcadores possuem alta aplicabilidade (95%), contudo podem não ser suficientemente específicos nos casos indeterminados, não conseguindo distinguir o grau de fibrose. Em tal situação é necessária a realização da biópsia hepática como método complementar (PAWLOTSKY et al., 2015).

Além destes fatores, com a suposição de que certos polimorfismos do gene que codifica a interleucina 28B (IL28B) poderiam modular a resposta endógena dos genes estimulados pelo interferon (ISG), que bloqueiam a replicação viral em diversas fases do ciclo viral. Estes genes são expressos geralmente após uma infecção viral ou após tratamento com interferon (SHIN; SUNG; PARK, 2016). Estudos de associação genômica ampla (GWAS) confirmaram que alguns polimorfismos localizados no cromossomo 19 (19q13), na região do gene da IL28B estão diretamente relacionados à depuração do vírus, tanto espontaneamente, como após o tratamento combinado (ANDRADE JUNIOR; ANDRADE, 2004).

Outro fator descrito, é a anemia dos pacientes com hepatite C crônica tratados com Peg-IFN- α + RBV (BRONOWICKI et al., 2006). De uma maneira geral, em até 30-35% dos pacientes tratados com Peg-IFN- α + RBV podem apresentar anemia moderada ou grave, com uma redução dos níveis de hemoglobina (Hb). A anemia induzida pela RBV influencia na doses da medicação em 15-25% dos pacientes (LOUSTAUD-RATTI et al., 2008; MCHUTCHISON et al., 2009). Além disso, a anemia hemolítica é dose-dependente. Geralmente ocorre entre a semana quatro e a semana doze do tratamento. O mecanismo de toxicidade da RBV é devido

ao acúmulo de ribavirina trifosfato (RBV-TP) nos eritrócitos. Onde uma alteração dos mecanismos oxidativos na membrana favorece a lise celular (DE FRANCESCHI et al., 2000).

A redução da concentração de hemoglobina, como ocorre na anemia, produz significantes reduções na capacidade total de transportar oxigênio do sangue. Nos homens adultos, o valor normal é de aproximadamente 14 g/dL, e o de mulheres 13 g/dL. A redução em estágios (redução de 200 mg) na dose de RBV é recomendada quando os níveis de hemoglobina são ≤ 10 g/dL e, suspensão deste fármaco quando os níveis de hemoglobina são $< 8,5$ g/dL (DEL RIO;

POST; SINGER, 2006). Uma diminuição na dose de RBV, especialmente nos estágios iniciais do tratamento, pode reduzir significativamente a taxa de RVS. A fim de não reduzir a dose de RBV, a administração do hormônio eritropoietina recombinante (EPO) é uma opção a considerar para evitar a anemia (AFDHAL et al., 2004).

O gene da inosina trifosfatase (ITPA) está localizado no cromossomo 20 e codifica a enzima inosina trifosfato pirofosfatase (ITPase) que está envolvida no metabolismo das purinas. A ITPase converte trifosfato de inosina (ITP) em monofosfato de inosina (IMP) (MAEDA et al., 2005; SHIPKOVA et al., 2006). Desta forma, o ITP não se acumula nas células normais. O ITP é usado para manter o trifosfato de adenosina (ATP) nos eritrócitos, prevenindo o estresse oxidativo. A deficiência de ITPase interrompe este ciclo, levando a um acúmulo de ITP nas células (CAO; HEGELE, 2002; MAEDA et al., 2005). A RBV é incorporada nos eritrócitos, sofrendo a fosforilação em sua forma farmacologicamente ativa através da adenosina quinase.

O trifosfato da RBV é incapaz de atravessar a membrana celular dos eritrócitos e se acumular intracelularmente, causando dano oxidativo e levando à hemólise (KEEFFE; KOWDLEY, 2005). A deficiência de ITPase causa o acúmulo de ITP nos eritrócitos que podem competir com o trifosfato da RBV, consequentemente protegendo a hemólise induzida por esta (KIM et al., 2013; SAKAMOTO et al., 2010; SHIPKOVA et al., 2006).

Duas variantes alélicas do gene da ITPA foram associadas a redução da atividade da ITPase, consequentemente resultando em aumento de concentrações de ITP. A primeira é uma substituição de prolina por treonina, onde na homozigose para a variante C do rs1127354, que implica na atividade normal de ITPase. A segunda variante alélica é um SNP que altera o *splicing* no segundo íntron, na qual variante A do rs7270101 tem atividade normal de ITPase (MAEDA et al., 2005; MOHANDAS et al., 1980; SHIPKOVA et al., 2006; SUMI et al., 2002). Além disso, a porcentagem da atividade enzimática varia em função da combinação com os diversos genótipo rs1127354 e rs7270101

Atualmente, com as novas DAA, direcionadas contra determinadas proteínas do HCV, tem-se observado menos efeitos adversos do que as terapias anteriores e possuem uma eficiência superior a 95%. As DAA são administradas em terapia combinada, livre de Peg-IFN- α e, em alguns casos, juntamente com RBV (LYNCH; WU, 2016; SCHEEL; RICE, 2013). Além disso, para pacientes coinfectados com HCV/HIV-1, as indicações são as mesmas, com possíveis ajustes na dose (EASL, 2016).

2.3 ASPECTOS GERAIS DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA

O vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) é o agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids). É um vírus pertencente ao gênero *Lentivirus* da família Retroviridae que foi isolado pela primeira vez em 1983 (BARRÉ-SINOUSSE et al., 1983; GALLO et al., 1984). O HIV-1 é classificado em tipo 1 ou 2, sendo que o HIV-1 apresenta maior virulência do que o HIV-2 e maior distribuição global. O HIV-1, por sua vez, é classificado em grupos, subtipos e formas recombinantes, sendo que 90% das infecções são devidas ao HIV-1 do grupo M, que é dividido em até nove subtipos (A-D, F-H, J, K) e mais de 50 formas recombinantes circulantes (CRF) (HEMELAAR, 2012).

Em uma escala global, múltiplas cepas de HIV-1 co-circulam e se distribuem de uma maneira desigual em diferentes regiões do mundo, sendo alguns subtipos mais frequentes em determinadas regiões e relacionados com distintas formas de transmissão. No entanto, em todo o mundo o subtipo C está associado com aproximadamente 48% das infecções (GERETTI,

2009). Sabe-se que determinados genótipos estão relacionados com alguns modos de transmissão e fatores de risco, por exemplo, subtipo F e uso de drogas endovenosas, subtipo C e transmissão heterossexual (RABONI et al., 2010). Apesar de não ser o mais frequente subtipo circulante, o HIV-1 genótipo B é o mais encontrado nos países industrializados, consequentemente, a maioria dos estudos e muito do que se conhece em relação a esta doença são aplicados para este genótipo. Mais de 30 anos após a sua descoberta, a alta diversidade genética do HIV-1 é o maior obstáculo para se conhecer as interações hospedeiro-patógeno (GASCHEN et al., 2002; LI et al., 2015).

O HIV-1 tem uma forma esférica com um diâmetro de aproximadamente 80-100nm. É constituído por três camadas, sendo que a camada externa é uma bicamada lipídica, contém 72 extensões formadas pelas chamadas glicoproteínas gp120 e gp41, que interagem facilitando a ligação do vírus à célula hospedeira. A camada intermediária é formada por uma matriz proteica e, a camada mais interna, consiste em um nucleocapsídeo icosaédrico, que contém o material genético e as enzimas necessárias para a replicação viral (TURNER; SUMMERS, 1999).

O genoma do HIV-1 é composto de um único RNA, de cadeia simples, composto por dois filamentos idênticos, contendo 9,8 kb cada um, com polaridade positiva. Contém nove genes, que codificam 15 proteínas virais. As proteínas estruturais são codificadas pelos genes gag (codifica as proteínas estruturais internas), pol (codifica as proteases, transcriptase reversa e integrase) e env (codifica as proteínas do envoltório) sendo que a sequência destes genes formam a maior parte do genoma viral. Os seis genes reguladores no genoma do HIV-1 são: tat (proteína transativadora transcripcional), rev (proteína reguladora da transcrição do gene viral), vpu (proteína viral *u*), vif (fator de infectividade do vírion), vpr (proteína viral *r*) e nef (proteína de efeito negativo) (FRANKEL; YOUNG, 1998).

O HIV-1 é capaz de infectar diferentes tipos celulares que expressam o antígeno CD4 em diferentes tecidos humanos, como linfócitos TCD4 +, monócitos, macrófagos, linfócitos B, células NK, células-tronco e células dendríticas no tecido linfóide; células da microglia e neurônios no tecido nervoso; células da mucosa do intestino grosso, do epitélio vaginal e células de Langerhans no tecido epitelial (SATTENTAU; WEISS, 1988), embora o alvo principal onde o HIV-1 se replica melhor são os linfócitos TCD4+ (SATTENTAU; WEISS, 1988).

A entrada do HIV-1 nas células-alvo dá-se pela fusão das glicoproteínas virais, gp41 e gp120, presentes no envelope viral, com o receptor de células humanas, o CD4, presentes nas membranas de linfócitos T e macrófagos, e com os co-receptores CCR5 e CXCR4, membros da família de quimiocinas, cujos genes estão localizados no braço curto do cromossomo 3

humano. No momento da infecção, o co-receptor CCR5 é via preferencial em relação ao CXCR4 que, em geral, é utilizado por alguns isolados virais na fase final da doença (PHILPOTT, 2003). O CCR5-Δ32 é um alelo mutante resultante da deleção de 32 pares de bases (pb) da região codificadora do gene CCR5 acarretando em um *códon* de parada prematuro que produz um receptor não funcional na superfície celular. No caso do *locus* CCR5, a baixa frequência dos alelos mutados indica que esse genótipo protetor é de rara confirmação (CARVALHAES et al., 2005).

Sendo assim, o ciclo de replicação do HIV-1 inicia quando a proteína do envelope gp120 do vírion se liga ao receptor da célula CD4 e ao co-receptor da quimiocina, CCR5 e/ou CXCR4 (WEISS, 2013) e ocorre fusão entre as membranas do vírus e a membrana plasmática celular liberando o capsídeo viral para o citoplasma, ocorrendo o processo de desmontagem da partícula viral (AMBROSE; AIKEN, 2014). Inicia a transcrição reversa do RNA genômico viral para o DNA complementar (cDNA) de cadeia dupla mediada pela transcriptase reversa viral (HU; HUGHES, 2012), o complexo de pré-integração (PIC) que contém o cDNA viral e a enzima integrase é transportado para o núcleo, onde o cDNA viral será integrado no genoma da célula hospedeira, mediadas pela integrase viral (BUSHMAN; CRAIGIE, 2014). O genoma viral integrado é chamado de provírus. Após a integração, os processos envolvidos na replicação viral começam. A enzima RNA polimerase II (pol II) reconhece e se liga o promotor viral na sequência 5' LTR (*Long Terminal Repeats*) do provírus e começa a transcrição do genoma viral (MBONYE; KARN, 2014).

A exportação nuclear de transcritos virais depende da proteína viral primária *rev*, que se liga ao fator de exportação para recrutar os transcritos virais e exportá-los para o citoplasma. Em seguida, o RNA mensageiro (RNAm) é traduzido resultando em diferentes proteínas virais, que serão montadas e serão direcionadas para a membrana plasmática para formar novas partículas virais imaturas, que irão sair da célula infectada por gemulação e irão conformar-se em um novo vírus infeccioso (JEANG, 2012).

No estado de integração, o provírus do HIV-1 pode adotar diferentes comportamentos: permanecer inativo, replicar-se de maneira controlada ou replicar-se massivamente na célula infectada, causando um efeito citopático (PILCHER et al., 2004). A duração do ciclo de vida do HIV-1 *in vivo* é estimada entre 24 e 48 horas (PERELSON et al., 1996). As células dendríticas (CD) desempenham um papel fundamental na exposição inicial ao HIV-1, são os principais mediadores na transmissão celular associada ao vírus. A alta expressão do receptor de lectina ligadora de manose, altamente eficaz para a inserção de partículas virais nas CD, permite ao HIV-1 a capacidade migratória de acessar os linfócitos T

nos gânglios linfáticos. O HIV-1 é capaz de permanecer dentro das CD internalizados em vesículas endocíticas intracelulares por até 5 dias, o que permite que ele tenha tempo suficiente para ser transportado para os compartimentos linfóides, onde o vírus pode ser disseminado (GEIJTENBEEK et al., 2000).

Com a entrada do vírus no hospedeiro, o processo de infecção começa:

a) Infecção aguda ou infecção primária ocorre durante as primeiras semanas que pode ser assintomática ou se apresentar com sintomas semelhantes à gripe ou mononucleose infecciosa que, após uma ou duas semanas se resolve espontaneamente. O período de janela imunológica, ou seja, até que os anticorpos específicos contra o HIV-1 sejam detectados são de 2 a 6 semanas, que marca a soroconversão do indivíduo. É caracterizada por altos valores de viremia plasmática, com valor máximo em duas semanas e uma diminuição no número de células TCD4⁺ por destruição direta ou indireta, devido ao aprisionamento nos órgãos linfóides como principais centros de replicação. O aparecimento da resposta mediada por linfócitos TCD8⁺ citotóxicos específicos para o HIV-1 capaz de controlar parcialmente a replicação viral permite a diminuição da carga viral (CV) e uma recuperação parcial do número de linfócitos TCD4⁺.

b) Infecção crônica, latência clínica ou fase assintomática é caracterizada por uma redução na replicação viral com um valor estável de viremia plasmática, mas em que há destruição persistente de células TCD4⁺ por processos apoptóticos induzidos pela hiperativação do sistema imunológico. A recuperação homeostática de linfócitos TCD4⁺ é insuficiente para compensar a perda e, o aparecimento de variantes de escape viral mais virulentas com o progresso da infecção acelera a destruição das células do sistema imunológico. A taxa de progressão da doença dependerá do equilíbrio dinâmico entre os fatores virais e imunológicos do hospedeiro. Esta segunda fase geralmente dura de 2 a 10 anos na ausência de terapia antirretroviral combinada (TARV). Cinquenta por cento das pessoas infectadas pelo HIV-1 desenvolvem sinais e sintomas de infecção, tais como uma diminuição acentuada nos linfócitos T CD4⁺, hiperplasia linfóide e/ou funções do sistema imunitário debilitadas (GOUGEON, 2003).

c) Aids, é o estágio mais avançado da infecção, com um aumento persistente da viremia e com uma deficiência subjacente na imunidade, refletida nos valores das células TCD4⁺ <200 células/μL de sangue. É comum o aparecimento de doenças infecciosas oportunistas e neoplasias relacionadas a aids, como sarcoma de Kaposi ou linfoma de Burkitt (DOUEK, 2003)

A introdução da terapia antirretroviral (TARV) em 1996 e o desenvolvimento de novos medicamentos eficazes constituíram um marco na infecção pelo HIV-1, controlando a carga viral e melhorando a qualidade e a expectativa de vida dos indivíduos infectados (ANTIRETROVIRAL THERAPY COHORT COLLABORATION., 2008). A recomendação de início precoce da TARV considera, além dos claros benefícios relacionados à redução da morbimortalidade em pessoas vivendo com o HIV-1/aids (PVHA), a diminuição da transmissão da infecção, além da disponibilidade de opções terapêuticas mais cômodas e bem toleradas (BRASIL, 2017c).

2.4 IMUNOPATOGENESE DA INFECÇÃO PELO HCV E HIV-1

A ativação do sistema imunológico é um dos principais mecanismos patogênicos da doença hepática (MARTÍNEZ-ESPARZA et al., 2015; WIEST et al., 2014). Assim, o aumento da expressão de CD38 em células T pode indicar um aumento do risco de progressão de CHC em pacientes coinfectados com HCV/HIV-1, bem como um risco aumentado de progressão para a aids. A inflamação é característica da infecção pelo HIV-1 e pelo HCV e desempenha um papel fundamental na patogênese da doença hepática em pacientes coinfectados (LIN et al., 2013; MÁRQUEZ et al., 2016; YOUNAS et al., 2016).

A inflamação está diretamente relacionada à disfunção endotelial, que implica no desenvolvimento de doenças hepáticas e aumento do risco cardiovascular (PASARIN et al., 2017). A expressão de CD38 identifica células imunes ativadas, incluindo células T CD8 + e CD4 + em infecções virais crônicas, como HCV e HIV-1 (HODOWANEC et al., 2015). Além disso, ocorre uma redução nas populações celulares de T CD38 + CD8 + ou CD4 + em pacientes que atingem SVR, o que não ocorre em indivíduos recidivantes, apesar da supressão semelhante da carga viral no final do tratamento. Isso pode indicar uma ativação imune persistente entre os pacientes recidivados em resposta ao antígeno presente abaixo dos níveis de detecção, como foi bem descrito em pacientes crônicos infectados pelo HIV-1 que são suprimidos virologicamente durante o TARV (BENITO et al., 2004; MEISSNER et al., 2017).

Os níveis plasmáticos de IL-6 são maiores em pacientes com infecção pelo HCV, particularmente em pacientes com fibrose avançada ou cirrose (DE OCA ARJONA et al., 2011; FRENCH et al., 2013; MÁRQUEZ et al., 2015; PETERS et al., 2014).

Além disso, o aumento dos níveis circulantes de IL-8 tem sido associado à progressão do CHC (ANDERSEN et al., 2011; ASSELAH et al., 2008; DIRCHWOLF et al., 2016; LANGHANS et al., 2013; SHIMODA et al., 1998; ZIMMERMANN et al., 2011). Já os níveis

plasmáticos aumentados de IP-10 estão relacionados à gravidade da doença hepática em pacientes infectados pelo HCV (ANDERSEN et al., 2011; BERENGUER et al., 2012b; HARVEY et al., 2003; PATEL et al., 2014; REIBERGER et al., 2008; SHMAGEL et al., 2016).

A IL-8 ou CXCL8 (*Motif Chemokine Ligand 8*), é uma quimiocina que induz a quimiotaxia de células que transportam os receptores CXCR1 e CXCR2, particularmente neutrófilos (CINAMON et al., 2001). Tem sido associada à progressão clínica em pacientes infectados pelo HIV-1 (HAISSMAN et al., 2009; THEA et al., 1996) e com HCV (ASSELAH et al., 2008; ZIMMERMANN et al., 2011). Sendo que, valores mais elevados indicam risco aumentado de progressão clínica e óbito em pacientes coinfectados com HCV/HIV-1. Além disso, pacientes coinfectados com maior grau de fibrose hepática, apresentaram valores mais elevados de IL-8 no plasma (ANDERSEN et al., 2011; DIRCHWOLF et al., 2016).

Já a IP-10 (*Interferon gamma-induced protein 10*) é uma quimiocina que está diretamente envolvida na resposta imune contra o HCV e, tem sido associada com a progressão clínica em pacientes infectados pelo HIV-1 (NOEL et al., 2016; STIKSRUD et al., 2016) e hepatite C (MARRA; TACKE, 2014). Na infecção pelo HCV, os níveis elevados de IP-10 no plasma têm sido associados com doenças hepáticas mais grave e a não eliminação do HCV (PATEL et al., 2014; SHMAGEL et al., 2016). Uma possível explicação é de que a liberação de IP-10 provoca transmigração endotelial e quimiotaxia de células TCD4⁺ para o tecido hepático, levando a um aumento da resposta inflamatória (OO et al., 2012)

Outro mecanismo antiviral contra o HCV é a secreção de IFN tipo III ou IFN- λ , composto pelas citocinas antivirais IFNL1, IFNL2 e IFNL3 ou IL29, IL28A e IL28B, respectivamente (HEMANN; GALE; SAVAN, 2017). A função dos IFNs e da sua capacidade de regular a imunidade é ainda mais impactada por vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) que foram identificados em estudos de GWAS (SYEDBASHA; EGLI, 2017). Vários SNP no IFNL3 estão associados à resposta a terapias baseadas em interferon e depuração natural do HCV (GE et al., 2009; SUPPIAH et al., 2009; THOMPSON et al., 2012).

A maioria dos estudos concluiu que o menor alelo dos SNP da IL28B rs12979860 (CT/TT) e rs8099917 (TG/GG) estão associados à redução da expressão de IFNL3 durante a infecção pelo HCV (HONG et al., 2016; PROKUNINA-OLSSON et al., 2013). No entanto, também foi demonstrado que o alelo TT do rs12979860 expressa níveis mais elevados de IFNL1 e IFNL3 em hepatócitos (FARKAS et al., 2001). Além disso, os pacientes com o genótipo rs12979860 CC ou rs8099917 TT também apresentaram maiores taxas de resolução espontânea da infecção aguda pelo HCV. No entanto, com a chegada das DAA, a genotipagem de IL28B perdeu o seu valor preditivo. Portanto, atualmente a genotipagem de IL28B tem

aplicação em contextos onde se utiliza Peg-IFN- α + RBV (EASL, 2015; FRIED et al., 2002; HADZIYANNIS, 2004; HOOFNAGLE et al., 2009; HSU et al., 2009; IDREES; RIAZUDDIN, 2009; MANNS et al., 2001; MCHUTCHISON et al., 1998; POYNARD et al., 1998, 2009; ROMERO-GÓMEZ et al., 2005; THOMAS et al., 2009)

Diante do exposto, até o momento, há pouca informação sobre a influência da infecção pelo HIV-1 na hepatite C crônica, e vice-versa, a nível do sistema imunológico em pacientes coinfectados brasileiros, bem como o conhecimento dos SNP da IL28B e da ITPA, fazendo necessário a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos de ambas as infecções. Além disso, fatores associados a variabilidade dos indivíduos portadores do HCV e/ou HIV-1 podem estar associadas com essa condição diferenciada na evolução do padrão da infecção e do controle da viremia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal, com coleta de dados e amostras biológicas em uma população de pacientes coinfectados com HCV/HIV-1.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CEP-HC-UFPR), sob registro CAAE: 34716414.9.0000.0096.

3.3 CASUÍSTICA

A seleção dos integrantes desse estudo foi realizada por meio de revisão dos prontuários dos pacientes em acompanhamento nos Ambulatórios de Infectologia e de Coinfecção e Hepatites Virais do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), ou por meio de indicação direta desses pelos seus médicos assistentes, no período compreendido entre os anos 2011-2016.

Foi realizada entrevista com os pacientes (APÊNDICE 1) e foram convidados a participar do estudo, sendo solicitada assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e coleta de amostras de sangue total em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), que foram prontamente encaminhados ao laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas, Curitiba para processamento imediato.

Foram incluídos no estudo indivíduos com diagnóstico confirmado de infecção pelo HCV e/ou coinfectados com HIV-1 em terapia pelo HCV, maiores de 18 anos e que tenham assinado o TCLE. Foram excluídos os indivíduos com o diagnóstico não confirmado de infecção para o HCV, HIV-1, HCV/HIV-1 ou que recusaram-se a assinar o TCLE. Diante disto, a população do estudo consistiu em:

- a) 41 indivíduos coinfectados com HCV/HIV-1
- b) 37 pacientes infectados pelo HCV.
- c) 38 pacientes infectados pelo HIV-1.

- d) 11 indivíduos aparentemente saudáveis, não testados para o HIV-1 e/ou HCV. Estas amostras foram disponibilizadas pelo Instituto Carlos Chagas, Fiocruz/Paraná, onde os testes foram realizados.

As variáveis do formulário analisadas foram: número de identificação; sexo; data de nascimento; idade; raça; naturalidade; procedência; escolaridade; uso de drogas; comportamento sexual; número de parceiros; tatuagens; *piercing*; recebimento de transfusão sanguínea antes do diagnóstico; abuso de álcool; Anti-HCV +; PCR-HCV +; genótipo; biópsias; resultados da biópsia; tratamento para o HCV; resposta ao tratamento para o HCV; teste para HIV-1; última carga viral do HIV-1; subtipo de HIV-1; TCD4+ (atual e nadir); TCD8+ (atual e nadir); tratamento antirretroviral; resultados de exames laboratoriais (AST, ALT, plaquetas, hemoglobina).

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Obtenção do concentrado de leucócitos (*buffy coat*)

A obtenção do concentrado de leucócitos foi realizada por meio da técnica de gradiente de densidade utilizando o reagente *Histopaque*® 1077 (Sigma-Aldrich), conforme instruções do fabricante. Em um tubo cônico de 15 mL foram adicionados 3 mL do reagente *Histopaque*® em igual volume de sangue total. Esse material foi centrifugado a 400 x g por 30 minutos, a porção contendo o *buffy coat* foi separada e transferida para outro tubo cônico, sendo adicionado 10 mL de solução salina fosfatada tamponada (PBS) com homogeneização por aspiração. O material foi centrifugado a 250 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado, recuperado o sedimento com 5 mL de PBS, procedendo-se nova centrifugação a 250 x g por 10 minutos. O *buffy coat* obtido foi ressuspenso em 1 mL de PBS e aliqotado para contagem do número de leucócitos em contador hematológico automatizado, e quando necessário, o número de células foi corrigido para uma obtenção de 10⁶ cels/mL. O material foi aliqotado e permaneceu armazenado a -80°C até a realização da extração do DNA.

3.4.2 Extração do DNA

O DNA total foi extraído a partir de 200 µL do concentrado de leucócitos, utilizando o kit comercial *PureLink*® *Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen CA, USA), segundo as

instruções dos fabricantes e foi quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop®ND-1000* (Thermo Fisher Scientific Inc. MA, USA).

3.4.3 Métodos utilizados para análise das características virais do HIV-1

Para cada reação de amplificação das diferentes regiões dos genes *env* e *pol* do HIV-1 foram utilizados entre 50 a 200 ng do DNA extraído para um volume final de reação de 25 µL ou 50 µL, 10 pmol de cada um dos primers, 1 U de Taq Platinum® DNA Polimerase (Invitrogen), 200 µM de deoxinucleotídeos trifosfatados, 1x tampão de PCR sem MgCl₂ (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume. Todas as reações incluíram um controle negativo. Nas reações de *nested*-PCR dos genes *env* e *pol*, foi utilizado um volume de 5 µL do produto da primeira reação como DNA molde.

Na Tabela 1 constam os iniciadores utilizados nas diferentes reações de amplificação. Todas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador Veriti® Thermal Cycler Applied Biosystems®.

TABELA 1-INICIADORES UTILIZADOS PARA AS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES DOS GENES ENV E POL DO HIV-1.

Iniciadores <i>env</i>	Sequência 5'- 3'	Posição em K03544 (HXB2)
ED5	ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG	6556–6581
ED12	AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG	7822–7792
ES7	* tgtaaacgacggccagtCTGTAAATGGCAGTCTAGC	7001–7020
ES8	*caggaaacagctatgaccCACTTCTCCAATTGTCCCTCA	7667–7647
Iniciadores <i>pol</i>	Sequência 5'- 3'	Posição em K03544 (HXB2)
g17S	AAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGGA	2017 – 2041
MMRT6	TTTTACATCATTAGTGTGGG	3647 – 3628
MMRT10	CAGGCTAATTTTTTAGGGAA	2077 – 2096
MMRT5	TAAATTTGATATGTCCATTG	3574 – 3555

FONTE: A Autora (2019)

NOTA: *sequência inicial (caixa baixa) complementar ao iniciador universal M-13. Posição dos nucleotídeos conforme sequência referência depositada no *GenBank* (disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide), K03544 (HXB2) para HIV-1.

As amplificações de regiões dos genes *env* e *pol* foram realizadas como previamente descrito (BELLO et al., 2008; DELWART et al., 1993). Na primeira reação de amplificação do

gene *env* (com iniciadores externos ED5 e ED12) e na *nested*-PCR (com iniciadores internos ES7 e ES8) as condições de termociclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização dos iniciadores a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos para a PCR I, e de 1 minuto na *nested*-PCR, com manutenção do produto amplificado em 4°C.

Para a primeira reação de amplificação do gene *pol* (com iniciadores externos g17S e MMRT6) e na *nested*-PCR (com iniciadores internos MMRT10 e MMRT5), seguiram-se as mesmas condições de termociclagem de *env*, alterando somente a temperatura de hibridização para 55°C e tempo de extensão para 1 minuto e 30 segundos nas duas reações.

Após a amplificação, os produtos de cada reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (gel a 2% para detectar os polimorfismos e 1% para os produtos amplificados dos genes *pol* e *env*) em tampão TBE (Tris-borato 45mM, EDTA 1mM), corado com brometo de etídio 0,01%, por aproximadamente 40 minutos a 100V, com posterior visualização do gel em transiluminador (UVP MultiDoc-It®) sob luz ultravioleta, para detecção dos produtos amplificados e devidos registros documentais.

A presença do produto amplificado nas reações *nested* para *env* e *pol* foi identificada pela presença de fragmento de aproximadamente 660 pb e 1440 pb, respectivamente. Esses produtos amplificados de *env* e *pol* foram purificados e utilizados para as etapas de sequenciamento nucleotídico.

Os produtos amplificados para as regiões dos genes *env* e *pol* foram purificados com o kit comercial *PureLink®PCR Purification Kit* (Life Technologies Carlsbad, CA, USA), segundo as orientações do fabricante. O material purificado foi quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop®ND-1000* (Thermo Fisher Scientific Inc. MA, USA), e foram armazenados a – 80°C até a realização das etapas de sequenciamento nucleotídico.

Os produtos purificados de *env* e *pol* foram submetidos a reação de sequenciamento nucleotídico. A reação foi realizada em microplaca de 96 poços (MicroAmp Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando o kit de sequenciamento *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA), conforme as orientações do fabricante. Foram realizadas duas reações para cada produto amplificado, uma com o iniciador direto e outra reação com o iniciador reverso da *nested*-PCR, com aproximadamente 30 ng de DNA para cada reação de sequenciamento de *env* e 100 ng de DNA para *pol*. A reação foi realizada em termociclador *Veriti® Thermal Cycler Applied Biosystems®*, com as condições de termociclagem: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, hibridização 50°C por 15

segundos e extensão a 60°C por 4 minutos, com manutenção do produto final em 4°C. Na sequência foi realizada a etapa de purificação e precipitação do material marcado amplificado, foram adicionados a cada poço da placa 66 µL de etanol absoluto, 2 µL de acetato de amônio 7,5 M e 10 µL de água ultrapura. A placa foi mantida em repouso no gelo, ao abrigo da luz. Em seguida foi realizada centrifugação a 2.200 x g por 45 minutos (Eppendorf Centrifuge 5430R). O material sobrenadante foi descartado por inversão da placa e foi adicionado a cada poço 100 µL de etanol 70%. Foi realizada nova centrifugação a 2.200 x g por 20 minutos e na sequência o sobrenadante foi descartado novamente por inversão da placa.

A placa foi mantida por até 12 horas em temperatura ambiente para secagem, ao abrigo da luz. Após, a placa foi lacrada e armazenada a - 20°C até o momento de ser encaminhada ao departamento responsável pelo sequenciamento. Posteriormente, no momento do sequenciamento, as amostras foram solubilizadas adicionando-se 10 µL de formamida *Hi-Di*TM (Applied Biosystems, Inc. USA) a cada poço, com posterior aquecimento em termociclador a 96°C por 5 minutos, e manutenção em gelo até a colocação da placa em sequenciador automático modelo *3500xL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Inc. USA), do departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

As sequências nucleotídicas foram previamente verificadas pelo *software Sequence Scanner 2.0* (Applied Biosystems) e posteriormente analisadas e editadas utilizando a ferramenta *DNASTAR Lasergene SeqMan Program version 7.0* (DNASTAR, Inc., Madison, WI). As sequências consenso geradas foram visualmente analisadas usando o programa MEGA versão 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) e *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999) e alinhadas por meio do programa *Clustal Omega* (SIEVERS et al., 2011).

A avaliação inicial da subtipagem foi realizada pela plataforma online *REGA HIV subtyping tool v.3.0* (disponível em <http://hivdb.stanford.edu/RegaSubtyping/>). Sequências referências HIV-1 grupo M foram extraídas do banco de dados LANL (*Los Alamos National Laboratory HIV Database*) e foram utilizadas para avaliações filogenéticas e de recombinação. A avaliação quanto a presença de clados recombinantes foi analisada pela ferramenta RIP (*Recombinant Identification Program*) (disponível em <https://www.hiv.lanl.gov>) e pelo programa *SimPlot 3.5.1* (LOLE et al., 1999) por meio do método de *bootscanning*, sendo utilizado o método de Neighbor-Joining, com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980), janela de 250 pb e um passo de 20 pb com 100 pseudoréplicas para avaliar o suporte dos grupamentos filogenéticos.

A reconstrução filogenética foi realizada pelo método de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood* - ML), usando o modelo de substituição nucleotídica GTR+I+Γ4, na plataforma MEGA versão 7.0.

A predição *in silico* do tropismo viral nas amostras dos indivíduos coinfectados com HIV foi realizada por meio da avaliação das sequências de aminoácidos da região da alça V3 - gp120 (amostras em triplicata), na plataforma online *Geno2Pheno - coreceptor* (LENGAUER et al., 2007) (disponível em <http://www.geno2pheno.org>), com razão de falso positivo de 10% (*Falso Positive Rate* – FPR). Esse programa realiza o processo de predição por modelos estatísticos complexos, em conjunto com marcadores clínicos do paciente, como contagem de células TCD4⁺ e TCD8⁺, carga viral, presença de deleção de 32 pares de base no gene que codifica o correceptor CCR5, e assim caracteriza os resultados indicando se determinada sequência genômica viral corresponde a um vírus que pode estar utilizando o correceptor celular CXCR4, englobando assim na mesma categoria vírus X4 e R5X4, ou se determinada sequência prediz ser um vírus R5 por estar utilizando o correceptor CCR5.

Para análise da presença de mutações de resistência foram avaliadas as sequências nucleotídicas de regiões do gene *pol* (PR/TR) das amostras dos indivíduos utilizando a ferramenta *Calibrated Population Resistance* (CPR) (GIFFORD et al., 2009), o qual utiliza o *Stanford Surveillance Drug Resistance Mutations*, que exclui da análise os polimorfismos mais comuns na avaliação da resistência (BENNETT et al., 2009).

3.4.4 Métodos utilizados para análise das características do co-receptor CCR5 e polimorfismo dos genes da IL28B e da ITPA do hospedeiro

Para cada reação de amplificação das diferentes regiões genômicas foram utilizados entre 50 a 200 ng do DNA extraído para um volume final de reação de 25 µL ou 50 µL, contendo as concentrações finais: 0,2 a 0,75 µM dependendo do iniciador de cada reação, 1 U de Taq Platinum® DNA Polimerase (Invitrogen), 200 µM de deoxinucleotídeos trifosfatados, 1x tampão de PCR sem MgCl₂ (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume. Todas as reações incluíram um controle negativo.

A presença de deleção de 32 pb no gene *CCR5* foi determinado por PCR convencional (MICHAEL et al., 1997) e o polimorfismo rs12979860 na região próxima ao gene codificante para a IL28B, por meio de PCR-CTPP (*Polymerase Chain Reaction with Confronting Two Pair-Primers*) (FERREIRA et al., 2013).

Na tabela 2 constam os iniciadores utilizados nas diferentes reações de amplificação. Todas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador Veriti® Thermal Cycler Applied Biosystems®.

TABELA 2 -. INICIADORES UTILIZADOS PARA AS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES DOS GENES HUMANOS DO CCR5 E IL28B.

Iniciadores <i>CCR5</i>	Sequência 5' - 3'	Posição em NC012637
p290	ACCAGATCTCAAAAAGAAGGTCT	8260-8282
P291	CATGATGGTGAAGATAAGCCTCACA	8484-8460
Iniciadores <i>IL28B</i>	Sequência 5' - 3'	Posição em AC011445
F1	GACGAGAGGGCGTTAGAGCG	28961-28980
F2	GAGCTCCCCGAAGGCGT	23832-23848
R1	CGAACCAGGGTTGAATTGCACTCC	29273-29250
R2	ATTGACCCTGAGCCTGCGTT	29360-29341

FONTE: A Autora (2019)

NOTA: NC012637 para gene *CCR5*; AC011445 para *IL28B*.

Para a amplificação de região do gene *CCR5* (reação usando os iniciadores p290 e p291) as condições de termociclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização dos iniciadores a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, e manutenção do produto amplificado em 4°C.

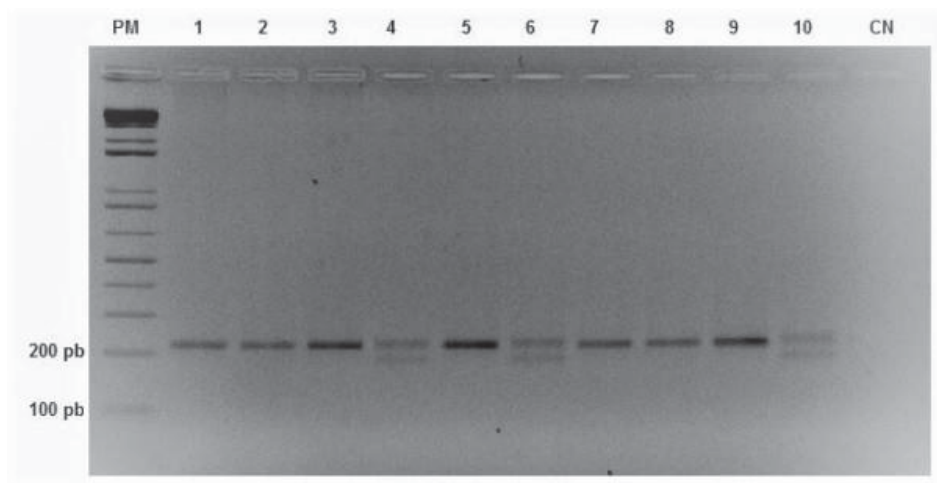
Para o polimorfismo rs12979860 (uma única reação de amplificação usando os iniciadores R1, F1, R2, F2) as condições de termociclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização dos iniciadores a 69,2°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos, com manutenção do produto final em 4°C.

Após a amplificação, os produtos de cada reação foram submetidos a eletroforese em gel a 2% de agarose em tampão TBE (Tris-borato 45mM, EDTA 1mM), corado com brometo de etídio 0,01%, por aproximadamente 40 minutos a 100V, com posterior visualização do gel em transiluminador (UVP MultiDoc-It®) sob luz ultravioleta, para detecção dos produtos amplificados e devidos registros documentais.

A partir da reação para identificação da presença da deleção de 32 pares de base no gene *CCR5* foram visualizados amplicons de 224 pares de bases (pb) correspondente ao alelo

sem deleção, e 192 pb quando da presença do alelo com deleção (CCR5-Δ32). A amplificação desse produto serviu como controle das demais reações de amplificação (FIGURA 1).

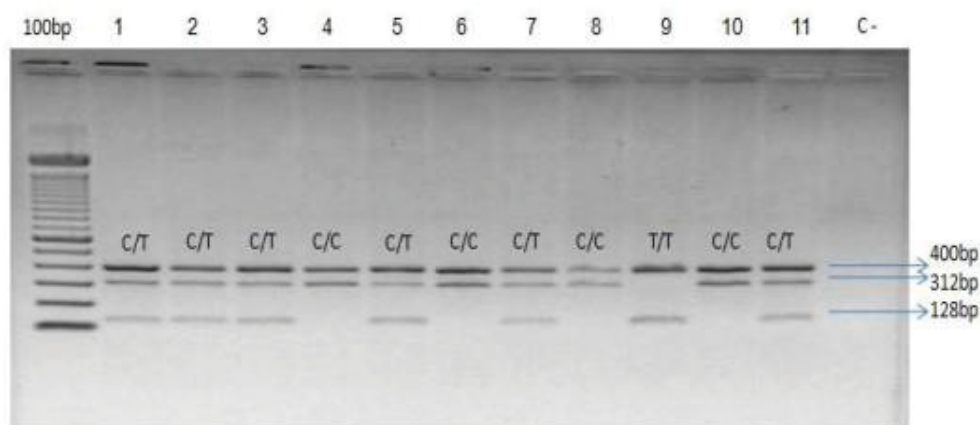
FIGURA 1-AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE DELEÇÃO DE 32pb NO GENE CC5 EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV-1



FONTE: Adaptado de Santos (2017)

O SNP rs12979860 na região do gene da IL28B foi determinado por meio de PCR convencional e avaliação direta dos produtos amplificados, como anteriormente relatado (FERREIRA et al., 2013). Para identificação do polimorfismo rs12979860 foram visualizados um fragmento de 400 pb, resultante do anelamento dos iniciadores R1 e F2, considerado como um controle positivo da reação do mesmo gene, e um produto de 312 pb na presença do alelo C e/ou um produto de 128 pb na presença do alelo T (FIGURA 2).

FIGURA 2-AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs12979860 DO GENE DA IL28B.



NOTA: As setas indicam o tamanho de cada fragmento amplificado.

FONTE: Adaptado de Ferreira (2013).

A genotipagem dos polimorfismos da ITPA (rs1127354; assay IDs: C_27465000_10 e rs7270101; assay IDs: C_29168507_10) foi realizada através da técnica de qPCR (PCR em tempo real) utilizando-se ensaios validados *TaqMan® Predesigned SNP Genotyping Assays* (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA).

Os ensaios *TaqMan genotyping* para os respectivos SNPs em estudo incluem dois iniciadores (*primers forward* e *reverse*) para a amplificação das regiões de interesse e duas sondas para detecção dos alelos. As sondas possuem: um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' [VIC para o alelo mutante com citosina (C) e FAM para o alelo selvagem com timina (T)]; um *minor groove binder* (MGB) que aumenta a temperatura de anelamento da sonda sem aumentar o seu comprimento, permitindo uma discriminação mais precisa dos alelos; um *quencher* não fluorescente (NFQ) na terminação 3' da sonda.

Para as reações de qPCR foram utilizados 4,0 µL de *master Mix Taqman*, 0,5 µL *TaqMan SNP Genotyping Assay* (40X), 2,0 µL (20 ng de DNA) e 3,5 µL de água ultrapura. As amostras foram amplificadas em equipamento Viia 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA) de acordo com a seguinte ciclagem: ativação da enzima *AmpliTaq Gold* a 95°C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento/extensão) e, uma extensão final de 60°C por 30 segundos. A discriminação e plotagem dos genótipos foram realizadas pelo *TaqMan® Genotyper Software* (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA).

Os possíveis genótipos para cada polimorfismo bialélico são rs1127354: C/C, A/C, A/A (alelo de menor frequência = A); rs7270101: A/A, A/C, C/C (alelo de menor frequência = C). A atividade da enzima ITPase foi definida pela presença de alelos menores nos respectivos sítios polimórficos. A deficiência de ITPA foi agrupada em: sem deficiência; leve (> 60% de atividade); moderada (30 a 60% de atividade); e grave (<30% de atividade) (THOMPSON et al., 2010, 2011) (FIGURA 3).

FIGURA 3- ATIVIDADE DA ENZIMA ITPase.

rs1127354	rs7270101	Atividade da ITPase (%)	Deficiência da ITPase
Selvagem CC	Selvagem AA	100	-
Selvagem CC	Heterozigoto AC	60	+
Heterozigoto CA	Selvagem AA	30	++
Selvagem CC	Homozigoto CC	30	++
Heterozigoto CA	Heterozigoto AC	10	+++
Homozigoto AA	Selvagem AA	< 5	+++

NOTA: A porcentagem da atividade enzimática varia em função da combinação com os diversos genótipo rs1127354 e rs7270101.

FONTE: Adaptado de Thompson et al., 2010.

3.4.5 Métodos utilizados para análise das quimiocinas IL-8 e IP-10

Foram utilizadas amostras de plasma, previamente armazenadas a - 80°C, para avaliar as dosagens das quimiocinas IL-8 e IP-10 nos pacientes monoinfectados com HCV e coinfectados com HCV/HIV-1. Para esta avaliação, foram incluídas amostras de indivíduos monoinfectados com HIV-1 e um grupo controle.

As dosagens plasmáticas das quimiocinas IL-8 e IP-10 foram mensuradas por citometria de fluxo utilizando *BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokine Kit* (BD Biosciences CA, USA), de acordo com as especificações do fabricante. Esse ensaio é um método de captura de analitos solúveis por microesferas (*beads*) de fluorescência conhecida conjugados a um anticorpo específico. O reagente de detecção do kit é formado por uma mistura de anticorpos monoclonais específicos contra cada uma das quimiocinas a serem testadas, conjugados com ficoeritrina (PE), que apresentam fluorescência distinta das microesferas. Quando ocorre a formação do complexo microesferas de captura + analito de interesse + reagente de detecção, ocorre um sinal de fluorescência proporcional a quantidade do analito presente na amostra que está sendo testada.

Os ensaios de dosagem das quimiocinas foram realizados no Instituto Carlos Chagas (ICC), FIOCRUZ, Curitiba-Paraná. Os testes e análises foram realizados na plataforma de Citometria do ICC [RPT08L]. Primeiramente, uma curva de diluição seriada foi preparada com a amostra padrão das quimiocinas a serem testadas. A reação de dosagem das quimiocinas foi realizada em placa de 96 poços, fundo em U. Foram adicionados a cada reação 10 µL de cada microesfera de captura, 25 µL de amostra de plasma (diluída 1:4) e 75 µL do reagente de detecção (*Human Chemokine PE Detection Reagent*), incubados em temperatura ambiente, por 3 horas, ao abrigo da luz. Na sequência, foi adicionado 100 µL de tampão de lavagem a cada reação, seguido de centrifugação a 1500 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão da placa, e o sedimento foi ressuspenso em 200 µL do tampão de lavagem. A placa foi levada para análise em equipamento *BD FACSCanto™ II 4.2.2* e os dados analisados pelo *software FCAP Array e FlowJo v.10*. As mensurações foram apresentadas em pg/mL.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram analisadas por estatística descritiva e analítica. Os dados foram digitados e compilados em planilhas Excel® e analisados utilizando o *software GraphPad Prism® v. 5.03* (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA).

As variáveis categóricas foram analisadas utilizando o teste exato de Fischer ou qui-quadrado, quando apropriado, e para as variáveis contínuas foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para comparação dos dados entre os grupos.

Os resultados das variáveis contínuas foram expressos como medianas e variações interquartis, e os valores calculados de p foram bicaudais tendo um valor de $p < 0.05$ considerado como estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES COINFECTADOS COM HIV-1.

Rev Soc Bras Med Trop 50(4):470-477, July-August, 2017
doi: 10.1590/0037-8682-0450-2016



Major Article

Profile of HIV subtypes in HIV/HBV- and HIV/HCV-coinfected patients in Southern Brazil

Valéria Miranda Avanzi^[1], Bianca Arão Vicente^[2], Nayara Carvalho Polido Beloto^[1],
Monica Maria Gomes-da-Silva^[2], Clea Elisa Lopes Ribeiro^{[2],[3]}, Felipe Francisco Tuon^{[1],[2]},
Luine Rosele Renaud Vidal^[4], Meri Bordignon Nogueira^[4] and Sonia Mara Raboni^{[1],[2]},

[1]. Programa de Pós Graduação em Medicina Interna, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil. [2]. Departamento de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil. [3]. Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba, Divisão Epidemiológica, Curitiba, PR, Brasil. [4]. Laboratório de Virologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Abstract

Introduction: HIV and viral hepatitis infections are major causes of chronic disease worldwide and have some similarities with regard to routes of transmission, epidemiology, front barriers faced during access of treatment, and strategies for a global public health response. The objective was to describe the HIV-1 subtypes, viral tropism and single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of interleukin 28B (*IL28B*) from a case series of HIV/viral hepatitis coinfected patients from southern Brazil. **Methods:** Clinical and epidemiological data were evaluated by a review of medical records. Periodic blood draws were taken to determine the viral and host characteristics. **Results:** This study included 38 patients with HIV/HBV or HIV/HCV coinfection; the median age was 49 years. Thirty-seven (97.4%) were on antiretroviral therapy, 32 (84.2%) had an undetectable viral load, a median CD4⁺ T-cell count of 452 cells/mm³. HIV-1 subtyping showed 47.4 and 31.6% of patients with subtypes C and B, respectively. Analysis of viral co-receptor usage showed a predominance of the R5 variant (64.7%), with no significant difference between the subtypes. Twenty patients with HIV/HCV coinfection were eligible to receive HCV therapy with pegylated-interferon-alpha plus ribavirin, and 10/20 (50%) of them achieved sustained virological response. SNPs of *IL28B* were evaluated in 93.3% of patients with HIV/HCV coinfection, and 17 (60.7%) presented the CC genotype. **Conclusions:** In the present case series, a higher frequency of HIV subtype C was found in coinfected patients. However such findings need to be prospectively evaluated with the inclusion of data from regional multicenter analyses.

Keywords: HIV. hepatitis C virus. hepatitis B virus. Coinfection. CCR5. *IL28B*.

INTRODUCTION

It has been estimated that 30% of people living with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome (PLWHA) are coinfecting with hepatitis C virus (HCV) or hepatitis B virus (HBV)¹. However, the prevalence of these coinfections is variable, reflecting differences in the regional sociodemographic profile and hepatitis B immunization coverage². In Brazil, the prevalence of HIV/HCV coinfection ranged from 3.3% to 82.4%, with an average of around 20.3%³. The introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) for PLWHA has increased their life expectancy, and chronic liver disease has become common among coinfected individuals, being the most frequent cause of hospitalization and mortality in these patients⁴. Meanwhile, the effect of coinfection

on HIV evolution is not completely understood; these patients present with frequent hepatotoxicity after HAART, and drug resistance, which can lead to treatment failure and limitations in alternative treatment regimens⁵.

In Brazil, HIV diversity is driven by the co-circulation of HIV-1 subtypes B, C, and F1. In recent years, several HIV-1 recombinant forms, mainly BF1 and BC subtypes, have frequently been reported⁶. This viral diversity, albeit controversial, may have some effect on transmission patterns, pathogenicity, therapy, and immune response. In addition, it is associated with various host cells and viral mechanisms. In the context of HIV/viral hepatitis coinfection, there are no reports on the genetic profile of HIV infection and the host immunological profile of these coinfected individuals in Brazil, as well as its effect on hepatic and HIV infection progression. This study aimed to describe the HIV subtypes and the epidemiological, immunological, and clinical profiles of HIV/viral hepatitis-coinfected patients from a reference center in the State of Paraná, Southern Brazil.

Corresponding author: Dra. Sonia Mara Raboni.
e-mail: sraboni@ufpr.br
Received 25 October 2016
Accepted 30 June 2017

METHODS

Study participants

A cross-sectional study was conducted, in which coinfecting outpatients identified in the referral clinics of *Hospital de Clínicas - Universidade Federal do Paraná* (HC/UFPR) from March 2011 to December 2015 were prospectively included. This tertiary-care academic hospital is the largest HIV referral center in the State of Paraná, southern Brazil, where 1,400 PLWH are currently being followed up, with HIV/HBV and HIV/HCV coinfection rates of approximately 1.3% and 4%, respectively⁷. HIV/HBV- or HIV/HCV-coinfecting patients were enrolled in the study according to the following inclusion criteria: age >18 years; positive serology for HIV (anti-HIV), positive serology for HBV (HBV-surface antigen or DNA), and/or polymerase chain reaction (PCR)-positive HCV; and voluntary participation by providing written informed consent. Patients with incomplete medical records, children, and those who did not agree to participate in the study were excluded. All information related to clinical, demographic and epidemiological data were obtained through a structured questionnaire and review of medical records. Venous blood was collected from the enrolled patients. The Institutional Review Board of HC/UFPR approved the study (IRB# 2304.198/2010/08).

Proviral DNA extraction, PCR amplification, and HIV-1 sequencing

A concentration of 10^7 peripheral blood mononuclear cells was separated by density gradient centrifugation (Histopaque® 1077 – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Proviral HIV-1 DNA was extracted using a commercial QIAamp DNA Blood Kit® (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Fragments of the *pol* (HXB2 clone positions 2077-3574) and *env* (HXB2 clone positions 7001-7667) genes were generated by nested PCR according to a previously reported method¹⁰. The DNA fragments were purified and sequenced with the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and the automated DNA sequencer (ABI 3500xL Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Analysis of the genetic diversity of HIV-1

Nucleotide sequences were edited using DNASTAR Lasergene SeqMan software v7.0 (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). For performing maximum likelihood phylogenetic analyses, HIV-1 group M subtype reference sequences of HIV-1 subtypes were retrieved from the Los Alamos database, (<http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/search/search.html>), and the tree was constructed using the best model with the algorithm implemented in the MEGA 6.0 package¹⁰. Recombination analysis was performed by bootscanning analysis using Simplot 3.5.1 software¹¹. The subtype assignment of sequences was confirmed using the REGA HIV Subtyping Tool v3.0 (<http://hivdb.stanford.edu/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/http://hivdb.stanford.edu/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/http://hivdb.stanford.edu/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/http://hivdb.stanford.edu/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>).

Resistance analysis

The resistance-associated mutation profile and antiretroviral (ARV) susceptibility were inferred by submitting the PR/RT sequences to the Calibrated Population Resistance Tool (v5.0 beta; <http://cpr.stanford.edu/cpr/servlet/CPR>) and the INT sequences to the Stanford HIV Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu/>).

Characterization of the CCR5 polymorphism and determination of HIV-1 co-receptor tropism phenotype

CCR5 receptor polymorphisms were analyzed in blood samples by PCR as previously described¹². Genotypic tropism test was performed using HIV envelope V3 loop sequences. Viral co-receptor usage predictions based on V3 sequences were performed by 11/25 rules, using Geno2pheno (<http://coreceptor.bioinf.mpg.de/cgi-bin/coreceptor.pl>) with a false-positive rate of 0.1, and using the Phenoseq platform (https://www.burnet.edu.au/facilities/9_phenoseq).

Testing for SNPs of IL28B

The single-nucleotide polymorphism (SNP) rs12979860 in the region of the interleukin 28B (IL28B) gene was analyzed using confronting two-pair primers as previously described¹³.

Statistical analyses

Demographic, epidemiological, clinical, and genetic data were compiled and analyzed using GraphPad Prism® software version 5.03 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Baseline demographic and clinical characteristics were presented as medians and interquartile ranges (IQRs). Univariate analysis using the Fisher's exact test was performed for each variable. The level of significance was set at 0.05.

Nucleotide sequence accession numbers

The sequences reported in this study were deposited in GenBank under accession numbers KU820990 to KU821019 and KU8823632 to KU883661.

RESULTS

A total of 38 HIV-positive patients were included in the study. Of these, 30 (79%) had HIV/HCV coinfection, while 8 (21%) had HIV/HBV coinfection. Most patients were male ($n = 27$; 71%), and the median age was 49 years (IQR: 44-75 years). With regard to the risk factors for HIV/HCV/HBV acquisition, 22 (58%) patients were drug users, with 14 (42.1%) being injection drug users. In general, the patients included in the study had a long duration of HIV infection, with a median duration of 17 years (IQR: 12-25 years); 32 (84.2%) patients had an undetectable viral load and showed an improvement in cell-mediated immune function, with a median nadir of 147 cells/mm³ and a CD4⁺ T-cell count of 452 cells/mm³. Thirty-seven (97.4%) patients had been treated with ART for a median duration of 14 years (IQR: 9-25 years).

The HIV *pol* and/or *env* genes of all patients were sequenced, with 47.4% ($n = 18$) of patients belonging to subtype C, 31.6% ($n = 12$) to subtype B, and 21% ($n = 8$) to circulating recombinant

forms (CRFs) (Figure 1). Genetic polymorphisms of the CCR5 co-receptor were evaluated in 35 individuals, and no case of partial deletion was found. Regarding viral receptor usage, there was a predominance of R5 tropism between B and C subtypes with no significant difference.

With regard to ARV resistance, six (15.8%) patients showed mutations related to resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) and one (2.6%) showed mutations related to resistance to non-NRTI; however, no mutation to protease inhibitors was found. Three (7.9%) patients had died. The epidemiological and clinical characteristics according to the HIV subtypes of all participants are summarized in Table 1.

Among the HIV/HBV-coinfected patients, seven (87.5%) were on ART. Three (43%) patients received HBV-specific therapy, which comprised a dual therapy of lamivudine and tenofovir, and one (14.3%) patient received a combination therapy of conventional interferon and lamivudine. There were no records of laboratory investigations of HBV treatment response.

Among the HIV/HCV-coinfected individuals, 20/30 (66.7%) were eligible for HCV therapy based on pegylated interferon alpha and ribavirin (PEG-IFN α /RBV); of these, 10/20 (50%) achieved sustained virological response (SVR), 9/20 (45%) showed no response, and 1/20 (5%) had relapsed. Regarding the SNPs of *IL28B* (rs12979860), 28/30 (93.3%) of patients were

examined, of which 16 (57.1%) presented the CC genotype (Table 2).

DISCUSSION

Most studies on the association of viral and host genetic profiles with the outcome and therapy response in HIV/viral hepatitis-coinfected patients have been conducted in populations infected with HIV-1 subtype B. This is the commonest variant in the USA and Western Europe but represents less than 15% of HIV-1 infections worldwide. This knowledge should not be directly extrapolated to all subtypes given the significant sequential differences observed in both the structural and regulatory genes of HIV-1 subtypes, which can influence the biological properties of the virus¹⁴.

A previous study conducted in southern Brazil have reported that subtype C is more prevalent in the heterosexual population, whereas subtype B is more prevalent in men who have sex with men (MSM) and men who have sex with men and women (MSMW)⁶. This greater predisposition of heterosexual transmission of subtype C compared with other subtypes seems to be related to the stronger preference for the female genital mucosa, which may also enable vertical transmission¹⁵.

With regard to the distribution by gender, age, the risk of contamination, and sexual behavior, HIV subtype prevalence in

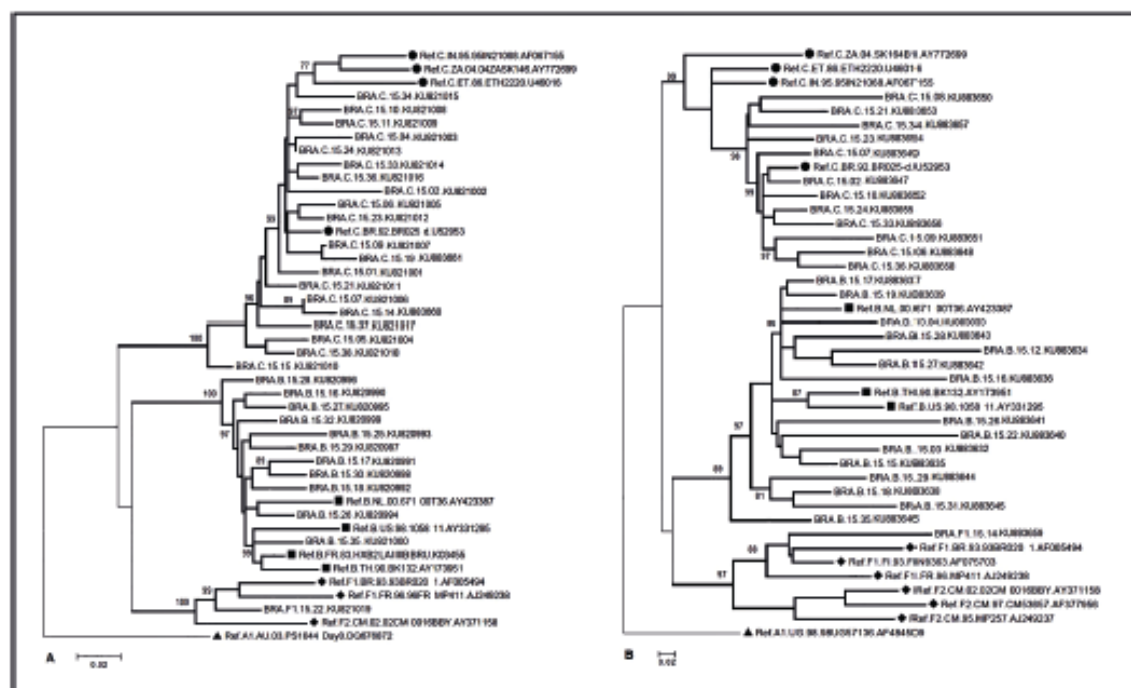


FIGURE 1 - Maximum likelihood phylogenetic trees for the *pol* (A) and *env* (B) HIV genes from the HIV/HCV- or HIV/HBV-coinfected Brazilian patients. Reference sequences (REF) were obtained from the Los Alamos National Laboratory database (<http://www.hiv.lanl.gov>) and are indicated by arbitrary symbols (■ = Subtype B; ◆ = Subtype F; * = Subtype C; ▲ = Subtype A). Numbers at branch nodes refer to the bootstrap support (only values greater than 75% are shown). Scale bar, 0.2 nucleotide substitutions per site. HIV: human immunodeficiency virus; HCV: hepatitis C virus; HBV: hepatitis B virus; BRA: Brazil.

TABLE 1
Epidemiological, clinical and viral characteristics of coinfecting patients according to the HIV subtype.

Characteristics	Subtype			p-value ^a
	B	C	Other ^a	
	(n = 12)	(n = 18)	(n = 8)	
	N (%)	N (%)	N (%)	
Gender				
male	9 (75.0)	11 (61.1)	7 (87.5)	0.10
female	3 (25.0)	7 (38.9)	1 (12.5)	
Age, years (median [IQR])	47 (44-75)	49 (44-75)	49 (44-75)	
Drug use				
yes	5 (41.6)	14 (77.8)	3 (37.5)	0.04
IVDU	3 (60.0)	9 (64.3)	2 (66.7)	
other	2 (40.0)	5 (35.7)	1 (33.3)	
no	7 (58.4)	3 (16.7)	3 (37.5)	
NI	0	1 (5.5)	2 (25.0)	
Sexual behavior				
MSM	2 (16.7)	1 (5.6)	0	NA
heterosexual	7 (58.3)	16 (88.8)	6 (75)	
bisexual	3 (25.0)	0	1 (12.5)	
NI	0	1 (5.6)	1 (12.5)	
Sexual partners per year (n)				
<2	7 (58.3)	15 (83.3)	3 (37.5)	NA
2-5	3 (25.0)	1 (5.6)	0	
≥5	2 (16.7)	0	3 (37.5)	
NI	0	2 (11.1)	2 (25.0)	
Hepatitis coinfection				
HBV	6 (50.0)	0	2 (25.0)	NA
HCV	6 (50.0)	18 (100.0)	6 (75.0)	
Number of years since diagnosed with hepatitis (median [IQR])	10 (7-23)	10 (9-23)	10 (8-23)	
Hepatitis therapy				
yes	8 (66.7)	11 (61.1)	5 (62.5)	NA
no	4 (33.3)	8 (38.9)	3 (37.5)	
HIV diagnosis length y (median/IQR)	17 (12-24)	17 (12-25)	16 (12-25)	
HIV viral load				
detectable (≥40 copies/mL)	0	5 (27.7)	1 (12.5)	NA
undetectable (<40 copies/mL)	12 (100.0)	13 (72.3)	7 (87.5)	

Continue....

TABLE 1 - Continuation.

CD4 ⁺ T lymphocyte value cells/mm ³ (median [IQR])				
nadir	188 (89-445)	193 (91-445)	133 (83-445)	
current	397 (283-967)	485 (285-1,038)	413 (283-1,038)	
ART use				
yes	12 (100.0)	18 (100.0)	7 (87.5)	NA
no	0	0	1 (12.5)	
CCR5 polymorphism				
wild	12 (100.0)	18 (100.0)	5 (62.5)	NA
NS	0	0	3 (37.5)	
HIV tropism				
CCR5	9 (75.0)	10 (55.6)	3 (37.5)	1.00
CCR5/CXCR4	3 (25.0)	4 (22.2)	5 (62.5)	
NS	0	4 (22.2)	0	
Death	1 (8.3)	1 (5.6)	0	NA

HIV: human immunodeficiency virus; IQR: interquartile range; IVDU: intravenous drug user; NI: not informed; MSM: men who have sex with men; NA: not applicable; HBV: hepatitis B virus; HCV: hepatitis C virus; CD4⁺: cluster of differentiation 4⁺; ART: antiretroviral therapy; CCR5: C-C chemokine receptor type 5; R5: R5-receptor tropic virus; R5/X4: R5/CXCR4-receptor tropic virus; NS: not subtyped; CRF: circulating recombinant forms; *Other: CRF subtypes: BC (6 cases), BF1 (1 case), CF1 (1 case). #P-value calculated between B and C subtypes. Bold values: statistically significant.

Curitiba shows a higher frequency of subtype B (55%), followed by subtype C (30%), subtype F (7.5%), and CRFs (7.5%)⁶. However, in the present study, the distribution of HIV-1 subtypes found in coinfecting patients was different from that reported, with a higher predominance of subtype C among these patients, and determining the effect of HIV-1 subtypes in the context of coinfection remains a challenge. In this study, some viral and host characteristics of HIV/viral hepatitis-coinfecting patients were evaluated in order to gain further knowledge about this issue. Furthermore, the results of the present study are in accord with previous investigations, that most HIV-1 subclade F1 strains circulating in Brazil may contain recombinant genomes¹⁶.

HIV-1 subtypes may exhibit differences in rates of transmission, disease progression, neurotoxicity, antiretroviral treatment failure profiles, and accuracy of viral load measurements¹⁸. Several clinical studies have addressed the differences in disease progression between viral subtypes and outcomes. Touloumi et al.¹⁷ revealed that CD4⁺ T lymphocyte decline was significantly slower for subtype A and CRF02 and marginally slower for subtype C compared to subtype B. In addition, a previous study reported that subtype D is associated with faster disease progression, rapid CD4⁺ T cell decline, and a higher rate of treatment failure compared to subtypes A, B, and C¹⁸. *In vitro* studies suggested that the replication of subtype C is less competent than that of subtype B¹⁹. In this study, the mutations related to resistance to ART did not affect clinical features, as most patients (n = 32; 94.7%) showed a good response to HIV treatment.

With regard to the CCR5 polymorphisms, no case of CCR5Δ-32 mutation was found. Previous studies in the Brazilian population showed that less than 10% of the investigated individuals carried the heterozygous CCR5Δ-32 genotype^{20,21}. The small number of participants included in the present study may have affected the detection of this mutation.

The application of bioinformatic tools in co-receptor usage determination has been widely investigated and could provide an alternative approach in clinical practice for screening candidates for CCR5 antagonist therapy, especially when confirmatory assays for co-receptor usage determination are unavailable²². In this study, the Geno2pheno and PhenoSeq analyses showed R5 and R5/X4 variants in 22/34 (64.7%) and 12/34 (35.3%) HIV samples, respectively. However, we found no case of CCR5Δ-32 heterozygosity, and it is possible that other genetic alterations or levels of expression, including specific cellular proteins such as restriction factors, APOBEC3, TRIM5, and Tetherin²³, could be associated with disease progression. In a study of patients with a slower progression to acquired immune deficiency syndrome conducted in the municipality of Curitiba, it was noted that the R5 variant was the most common type for this patient group (95%)²⁴. However, all these studies were conducted in HIV-monoinfected patients; thus, we do not know if the behavior of HIV is different in patients coinfecting with viral hepatitis. Because of the effect of coinfection on the progression of the disease, we expected that a greater number of patients would express the R5/X4 co-receptor.

TABLE 2
HIV, host genetic characteristics, pathological findings, and therapy response according to HCV genotype.

Characteristics	HCV genotypes N = 30*			
	1 n = 20 (%)	2 n = 1 (%)	3 n = 6 (%)	4 n = 1 (%)
HIV subtype				
B	4 (20.0)	0	1 (17.0)	1 (100.0)
C	10 (50.0)	1 (100.0)	5 (83.0)	0
other**	6 (30.0)	0	0	0
Hepatic biopsy†				
yes (N = 25)	18 (90.0)	0	6 (100.0)	1 (100.0)
hepatic steatosis (N = 16)	11 (61.1)	0	4 (66.7)	1 (100.0)
fibrosis (N = 20)	15 (83.3)	0	4 (66.7)	1 (100.0)
cirrhosis (N = 7)	6 (33.3)	0	1 (16.7)	0
normal (N = 1)	1 (5.6)	0	0	0
no (N = 5)	2 (10.0)	1 (100.0)	0	0
HCV therapy				
yes (N = 20)	15 (75)	0	4 (66.7)	1
SVR (N = 10)	5 (33.3)	0	4 (100.0)	1 (100.0)
null response (N = 9)	9 (60.0)	0	0	0
relapse viral (N = 1)	1 (6.7)	0	0	0
no (N = 10)	5 (25.0)	1 (100.0)	2 (33.3)	0
IL28B (rs12979860)				
CC	10 (50.0)	1 (100.0)	5 (83.3)	0
CT	8 (40.0)	0	1 (16.7)	1 (100.0)
NS	2 (10.0)	0	0	0

HIV: human immunodeficiency virus; HCV: hepatitis C virus; SVR: sustained virological response; IL28B: interleukin 28B; NS: not subtyped; CRF: circulating recombinant forms; * HCV genotyping was not performed in two patients. **Other: CRF subtypes = BC (6 cases), BF1 (1 case), CF1 (1 case).

In Brazil, data on HBV/HIV coinfection are limited, and some studies conducted in the southern, southeastern, and midwestern regions revealed a prevalence ranging from 3.7 to 36.9%²⁵⁻²⁷. In this study, we identified only a small number of HBV/HIV-coinfecting individuals probably because of the low frequency of laboratory investigations for HBV in drug users, as well as the routine vaccination against HBV in HIV-infected patients.

Vaccination against HBV for high-risk individuals and children younger than 1 year of age was included in the National Immunization Program in Brazil in 1996; in 2001, immunization against HBV was expanded to include young people up to 19 years of age²⁸. Currently, the vaccination program has been extended to individuals up to 49 years of age, in addition to all HIV-infected patients²⁹. However, as HIV+ individuals

respond poorly to the HBV vaccine, regular monitoring of the immunological status in these patients is recommended³⁰.

Previous studies have reported that in the treatment of HCV/HIV-coinfecting patients on dual therapy, SVR was achieved in approximately 20-40% of those with HCV genotype-1/4 (GT1/4) and 50-60% of those with HCV genotype 2/3 (GT2/3)³¹. The baseline predictors for PEG-IFN α /RBV therapy response include age, sex, HCV genotype, HCV viral load, liver fibrosis, and SNPs of the *IL28B* gene³². The efficiency of treatment with PEG-IFN α /RBV was limited in patients with HCV monoinfection, and only 45-55% of the patients infected with HCV genotype-1 (GT1) achieved SVR³³.

The *IL28B* gene encodes interferon- λ 3, which has strong antiviral activity, and this cytokine can activate cell signaling

pathways that control viral replication³⁴. Recent studies have demonstrated the effect of some favorable genotypes (the CC and TT genotypes, and the C and T alleles of polymorphisms rs8099917 and rs12979860, respectively) on the response to the standard treatment for chronic hepatitis C, as well as their relationship with spontaneous HCV clearance in mono- and coinfecting individuals^{35,36}.

Lunge et al.³⁶ reported the correlation between the SNP rs12979860 and the spontaneous clearance of HCV in a population of HIV-coinfecting Brazilian patients. The presence of the CT and TT genotypes increased the risk of developing chronic infection by three times compared to the CC genotype. In this study, 16/30 (53.3%) individuals presented favorable genotypes (CC) for the SNP rs12979860. However, only 8/19 (42.1%) achieved SVR; we believe that other factors are associated with the outcome. Bertol et al.³⁷ suggested that SNPs near the *IL28B* gene exert a significant influence on the establishment of HCV infection in HCV-monoinfected patients, contributing to a better understanding of the susceptibility, natural history of HCV infection, and the high rate of SRV in this patient group. However, Martin et al.³⁸ and Nattermann et al.³⁹ did not observe any correlation between the SNP rs12979860 and HIV-monoinfected patients; there was no significant difference in the susceptibility to HIV infection, the progression of the disease, or the clinical and laboratory parameters such as viral load. Therefore, SNPs of the *IL28B* gene seem to be associated with HIV only when there is coinfection with HCV³⁹.

The small number of participants is the major limitation of this study; therefore, it was not possible to make inferences about the impact of viral characteristics and some host genetic factors on the outcome. However, with the currently high survival rate of HIV+ individuals, HCV-related liver disease in coinfecting patients is becoming a major cause of morbidity and mortality, and the burden of HIV/HCV coinfection is poorly understood⁴⁰. In Brazil, descriptive studies of this nature face several difficulties, including the need for expertise and financial investment to perform laboratory tests, resulting in cohorts with a small number of cases.

Despite these limitations, this study provides insights regarding the clinical and laboratory profile of HIV/viral hepatitis-coinfecting patients in the country. In addition, our findings emphasize the importance of screening for viral hepatitis when individuals are identified as HIV positive and vice versa. Moreover, the management of viral hepatitis should be integrated into HIV treatment programs, including effective treatment for a triple infection (HIV/HCV/HBV), as well as vaccination for HBV-negative individuals with HIV to reduce HIV-related morbidity and mortality.

In conclusion, in the present case series, a higher frequency of HIV-1 subtype C was found in patients with HIV/viral hepatitis coinfection, and there was a predominance of R5 tropism between both B and C subtypes. Genetic polymorphisms for the CCR5 co-receptor were not found, and most patients presented the favorable genotype regarding the SNPs of *IL28B*. Further larger-scale and long-term studies are needed to assess the effect of HIV-1 subtypes on the progression of viral hepatitis,

as well as for the analysis of other markers that may influence the interaction between pathogens and the host response, affecting its outcome.

Acknowledgements

The authors thank the virology laboratory team for helping us with the technical training.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Financial support

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (#444819/2014-2 MCTI/CNPq/Universal 14/2014). SMR is on a fellowship from CNPq.

REFERENCES

1. Lacombe K, Rockstroh J. HIV and viral hepatitis coinfections: advances and challenges. *Gut*. 2012;61(Suppl 1):i47-58.
2. Brandão NAA, Pfrimer IAH, Martelli CMT, Turchi MD. Prevalence of hepatitis B and C infection and associated factors in people living with HIV in Midwestern Brazil. *Brazilian J Infect Dis*. 2015;19(4):426-30.
3. Kuehlkamp VM, Schuelter-Trevisol F. Prevalence of human immunodeficiency virus/hepatitis C virus co-infection in Brazil and associated factors: a review. *Brazilian J Infect Dis*. 2013;17(4):455-63.
4. Buskin SE, Barash EA, Scott JD, Aboulafia DM, Wood RW. Hepatitis B and C infection and liver disease trends among human immunodeficiency virus-infected individuals. *World J Gastroenterol*. 2011;17(4):1807-16.
5. Kumar R, Singla V, Kacharya SK. Impact and management of hepatitis B and hepatitis C virus co-infection in HIV patients. *Trop Gastroenterol*. 2008;29(3):136-47.
6. Raboni SM, de Almeida SM, Rotta I, Ribeiro CEL, Rosario D, Vidal LR, et al. Molecular epidemiology of HIV-1 clades in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(8):1044-9.
7. Raboni SM, Tuon FF, Beloto NCP, Demeneck H, Oliveira A, Largura D, et al. Human immunodeficiency virus and hepatitis C virus/hepatitis B virus co-infection in Southern Brazil: clinical and epidemiological evaluation. *Brazilian J Infect Dis*. 2014;18(6):664-8.
8. Bello G, Passaes CP, Guimarães ML, Lorete RS, Matos Almeida SE, Medeiros RM, et al. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. *AIDS*. 2008;22(15):1993-2000.
9. Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Rübsamen-Waigmann H, et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science*. 1993;262(5137):1257-61.
10. Waddell PJ, Steel M. General time-reversible distances with unequal rates across sites: mixing γ and inverse Gaussian distributions with invariant sites. *Mol Phylogenet Evol*. 1997;8(3):398-414.
11. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol*. 1999;73(1):152-60.

12. Michael NL, Chang G, Loum LG, Mascola JR, Dondero D, Birx DL, et al. The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med*. 1997;3(3):338-40.
13. Ferreira CS, Abreu RM, da Silva MC, Ferreira AS, Nasser PD, Carrilho FJ, et al. A fast and cost-effective method for identifying a polymorphism of interleukin 28B related to hepatitis C. *PLoS One*. 2013;8(10):e78142.
14. Rivero-Juárez A, Camacho A, Merchante N, Pérez-Camacho I, Macías J, Ortiz-García C, et al. Incidence of liver damage of uncertain origin in HIV patients not co-infected with HCV/HBV. *PLoS One*. 2013;8(7):e68953.
15. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med*. 2012;18(3):182-92.
16. Easterbrook PJ, Smith M, Mullen J, O'Shea S, Chrystie I, de Ruiter A, et al. Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy. *J Int AIDS Soc*. 2010;13:4.
17. Touloumi G, Pantazis N, Pillay D, Paraskevis D, Chai M-L, Bucher HC, et al. Impact of HIV-1 subtype on CD4 count at HIV seroconversion, rate of decline, and viral load set point in European seroconverter cohorts. *Clin Infect Dis*. 2013;56(6):888-97.
18. Tebit DM, Nankya I, Arts EJ, Gao Y. HIV diversity, recombination and disease progression: how does fitness "fit" into the puzzle? *AIDS Rev*. 2007;9(2):75-87.
19. Ariën KK, Abrahams A, Quinones-Mateu ME, Kestens L, Vanham G, Arts EJ. The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. *J Virol*. 2005;79(14):8979-90.
20. Passos Jr GAS, Proença Picanço V. Frequency of the Δ CCR5 deletion allele in the urban Brazilian population. *Immunol Lett*. 1998;61(2-3):205-7.
21. Musel SM, Borelli SD, Amarante MK, Voltarelli JC, Aoki MN, de Oliveira CEC, et al. Association study of CCR5 delta 32 polymorphism among the HLA-DRB1 Caucasian population in Northern Paraná, Brazil. *J Clin Lab Anal*. 2008;22(4):229-33.
22. Santos JS, Ribeiro CE, Almeida SM, Raboni SM. Clinical, virologic and immunological outcomes in a cohort of long-term non-progressor HIV infected patients, Southern Brazil. *J AIDS Clin Res*. 2015;6(9):502.
23. Franco E, Bagnato B, Marino MG, Meleleo C, Serino L, Zaratti L. Hepatitis B: epidemiology and prevention in developing countries. *World J Hepatol*. 2012;4(3):74-80.
24. Souza MG, Passos ADC, Machado AA, Figueiredo JFC, Esmeraldino LE. HIV and hepatitis B virus co-infection: prevalence and risk factors. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37(5):391-5.
25. Treitinger A, Spada C, Silva EL, Miranda AF, Oliveira OV, Silveira MV, et al. Prevalence of serologic markers of HBV and HCV infection in HIV-1 seropositive patients in Florianópolis, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 1999;3(1):1-5.
26. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Imunização: 30 anos. Brasília: Ministério da Saúde; 2003. 212 p.
27. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e das Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Manejo da Infecção por HIV em Adultos. Brasília: Ministério da Saúde; 2003. 227 p.
28. Rockstroh JK, Bhagani S. Managing HIV/hepatitis C co-infection in the era of direct acting antivirals. *BMC Med*. 2013;11:234.
29. Jiménez-Souza MA, Fernández-Rodríguez A, Guzmán-Fulgencio M, García-Alvarez M, Resino S. Meta-analysis: implications of interleukin-28B polymorphisms in spontaneous and treatment-related clearance for patients with hepatitis C. *BMC Med*. 2013;11(1):6.
30. Kourtis AP, Bulters M, Hu DJ, Jamieson DJ. HIV-HBV Coinfection - A Global Challenge. *N Engl J Med*. 2012;366(19):1749-52.
31. Lens Garcia S, Coto-Llerena M, Pérez del Pulgar Gallart S, Fornis Bernhardt X. Genetics and hepatitis C treatment: towards a personalized treatment? *Gastroenterol Hepatol*. 2011;34(5):352-60.
32. Balagopal A, Thomas DL, Thio CL. IL28B and the control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 2010;139(6):1865-76.
33. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009;461(7265):798-801.
34. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet*. 2009;41(10):1100-4.
35. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*. 2009;41(10):1105-9.
36. Lunge VR, da Rocha DB, Bérria JU, Tietzmann DC, Stein AT, Simon D. IL28B polymorphism associated with spontaneous clearance of hepatitis C infection in a Southern Brazilian HIV type 1 population. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(2):215-9.
37. Bertol BC, Moreira S, Garcia RFL, Ferreira LE, DeBortoli G, Pinho MSL, et al. IL28B gene polymorphisms in mono- and HIV-coinfected chronic hepatitis C patients. *Front Microbiol*. 2015; 6:153.
38. Martin MP, Qi Y, Goedert JJ, Hussain SK, Kirk GD, Keith Hoots W, et al. IL28B polymorphism does not determine outcomes of hepatitis B virus or HIV infection. *J Infect Dis*. 2010;202(11):1749-53.
39. Nattermann J, Vogel M, Nischalke HD, Danta M, Mauss S, Stellbrink HJ, et al. Genetic variation in IL28B and treatment-induced clearance of hepatitis C virus in HIV-positive patients with acute and chronic hepatitis C. *J Infect Dis*. 2011;203(5):595-601.
40. Platt L, Easterbrook P, Gower E, McDonald B, Sabin K, McGowan C, et al. Prevalence and burden of HCV co-infection in people living with HIV: A global systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(7):797-808.

4.2 PERFIL DOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPS) DA IL28B E ITPA NOS PACIENTES MONOINFECTADOS COM HCV E COINFECTADOS COM HCV/HIV-1.



IL28B and ITPA Single Nucleotide Polymorphisms in a Cohort of Patients with HCV and HCV/HIV, Southern Brazil

Avenzi VM¹, Vicente BA², Gomes-da-Silva MM², Vidal LRR³, Nogueira MB³, Tuon FF^{1,2} and Raboni SM^{1,2,3*}

¹Postgraduate Program in Internal Medicine and Health Science, Universidade Federal do Paraná, Brazil

²Infectious Diseases Division, Universidade Federal do Paraná, Brazil

³Laboratory of Virology, Universidade Federal do Paraná, Brazil

Abstract

Objective: The aim of this study is to describe the single nucleotide polymorphisms (SNP) in human genes for IL28B and ITPA of HIV/HCV coinfecting patients followed at a referral Hospital of Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Methods: A cross-sectional study was carried out. HIV/HCV coinfecting and HCV mono-infected patients were enrolled. Clinical and epidemiological data from medical records were reviewed, and peripheral blood was collected to analyze the IL28B and ITPA SNPs.

Results: A total of 37 HCV- and 41 HCV/HIV-positive subjects were included in the study, 13 (35.1%) mono-infected subjects were previously treated, 12 (92.3%) with PEG-INF α /RBV and of these, 8 (61.5%) had sustained virological response (SVR). Regarding HCV/HIV coinfecting patients, 23 (56.1%) received treatment with PEG-INF α /RBV and 12 (52.1%) had SVR. IL28B CC genotype was found in all HCV mono-infected patients and in 56.5% of coinfecting subjects. Regarding ribavirin-induced anemia, all patients showed the ITPA SNP favorable for this event, and anemia was present in 38.5% of mono-infected and in 65.2% of coinfecting patients.

Conclusion: With the availability of direct-acting antivirals (DAAs) for the treatment of chronic infection by the hepatitis C virus, free-INF regimens have been implemented worldwide. However, in the setting of HIV/HCV coinfection ribavirin will continue to compose some therapeutic schemes. Thus, tests related to genetic markers that influence the response to HCV treatment should be recommended in pretreatment, since results would benefit both the patient and the public healthcare system, guiding rational drug use in situations where responses to treatment are particularly low and adverse effects are high.

Keywords: Coinfection; HIV/HCV; HIV; HCV; SNP; IL28B; ITPA

Background

The prevalence of HIV/HCV coinfection in Brazil ranges from 3.3% to 82.4% with average of 20.3% [1]. HIV/HCV coinfection is a significant risk factor for liver fibrosis, since HIV seropositivity and low CD4+ counts seem to accelerate this process [2,3]. In addition, HCV infection has been shown to be associated with faster progression to acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) [4]. Until 2011, the standard treatment of chronic hepatitis C consisted of a combination of pegylated-interferon-alpha plus ribavirin (PEG-INF α /RBV).

Currently, a new era in the treatment of chronic HCV infection began with the approval of direct-acting antiviral drugs (DAAs) oral medications in interferon-free regimens. However, in HIV/HCV coinfection the PEG-INF α /RBV combination remains recommended [5].

Therefore, the evaluation of prediction of sustained virological response (SVR) to PEG-INF α based therapy must be maintained seeking to identify patients with high chance to cure and, consequently, candidates for this therapy and those with low chance to respond to PEG-INF α /RBV, candidates for interferon-free therapies. Moreover, treatment failure is likely to occur due to inherent viral and host factors such as the presence of certain SNPs and inappropriate drug regimens [6] and deeper analysis of non-response may help elucidate its molecular mechanisms [7].

In this setting, genetic variation in interleukin 28B (IL28B) and inosine triphosphatase (ITPA) genes are known host genetic factors that play a vital role in the clearance of HCV infection and in the risk of ribavirin-induced hematologic toxicity, respectively [8]. Currently, with

reports of therapeutic failure to DAAs, it has been recommended to evaluate viral and host factors predictors of treatment efficacy, among which are cited resistance-associated variants (RAVs) detection and IL28B SNPs [9]. Besides that, data on HIV/HCV coinfecting patients and the impact of host IL28B and ITPA SNPs on treatment response and toxicity in Brazilian patients are scarce. In this study we describe the epidemiological, genetic and clinical profile of a cohort of HIV/HCV coinfecting patients in follow up in a tertiary care academic hospital in Southern Brazil.

Methods

Study subjects

A cross-sectional study was carried out, in which HIV/HCV coinfecting outpatients identified in reference clinics of Hospital de Clínicas - Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR) were prospectively included from March 2011 to April 2016. HCV or HIV/

*Corresponding author: Raboni SM, Infectious Diseases Division, Universidade Federal do Paraná, Rua General Carneiro, 180, 3rd floor, 82060-900 Curitiba, PR, Brazil; Tel: +55 41 33607974; Fax: +55 41 33601811; E-mail: sraboni@ufpr.br

Received July 25, 2016; Accepted August 11, 2016; Published August 18, 2016

Citation: Avenzi VM, Vicente BA, Gomes-da-Silva MM, Vidal LRR, Nogueira MB, et al. (2016) IL28B and ITPA Single Nucleotide Polymorphisms in a Cohort of Patients with HCV and HCV/HIV, Southern Brazil. J AIDS Clin Res 7: 610. doi: 10.4172/2155-6113.1000610

Copyright: © 2016 Avenzi VM, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

HCV coinfecting patients were enrolled in the study. Patients with incomplete medical information, children and those who did not agree to participate in the study were excluded. All information related to clinical, demographics and epidemiological data were obtained through a structured questionnaire and medical record reviews. Included patients were submitted to a collection of 5 mL venous blood. The Institutional Review Board of HC/UFPR approved the study (IRB# 34716414.9.0000.0096).

Genotyping

The SNP rs12979860 in the region of the IL28B gene was carried out by confronting two-pair primers (CTPP), as previously reported [10]. SNPs rs1127354 and rs7270101 in chromosome 20 for ITPA gene were performed using the ABI TaqMan allelic discrimination kit and the ABI7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA), as previously described [11]. The possible genotypes for each biallelic polymorphism are rs1127354: C/C, A/C, A/A (minor allele=A); rs7270101: A/A, A/C, C/C (minor allele=C). ITPase activity was defined by the presence of minor alleles at the respective polymorphic sites [11,12]. ITPA deficiency has been grouped into none; mild (>60% activity); moderate (30–60% activity); and severe (<30% activity).

Statistical analyses

Demographics, epidemiological, clinical and genetic data were compiled and analyzed using GraphPad Prism® software version 5.03 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Baseline demographics and clinical characteristics with normal and non-normal distributions were presented as means ± standard deviations and medians with interquartile ranges (IQR), respectively. The Fisher's exact test, chi-squared test, or Wilcoxon-Mann-Whitney test were used where appropriate. The significance level was set at $P < 0.05$.

Results

A total of 37 HCV- and 41 HCV/HIV-positive subjects were included in the study. The demographics, clinical and virological data of the study population are described in Table 1. Regarding HCV therapy, 13 (35%) mono-infected subjects were treated, 12 (92%) with PEG-IFN α /RBV and one (8%) with simeprevir and sofosbuvir. Among treated patients, 8 (61.5%) had SVR, 4 (31%) had null response and 1 (8%) relapsed. Only 2 (15%) patients had liver biopsy and both presented fibrosis. Regarding HCV/HIV coinfecting patients, 23 (56%) were treated for HCV with PEG-IFN α /RBV. Of these, 12 (52%) had SVR, 9 (39%) had null response and 2 (9%) relapsed. Twenty (49%) patients had liver biopsy and 18 (90%) had fibrosis, 14 (70%) had hepatic steatosis, 6 (30%) presented cirrhosis, and only one (5%) showed no liver disorders. Additionally, 3 (7%) patients died, two due to liver complications. The results of the IL28B genotype (SNP rs12979860) and the relationship with the response to treatment, as well as the genotype for ITPA SNPs (rs7270101 and rs1127354) and the ribavirin-induced anemia are shown in Figure 1. The predicted ITPase activity distribution according to compound genotype of rs7270101 and rs1127354, as previously determined by biochemical analyses, is shown in Table 2.

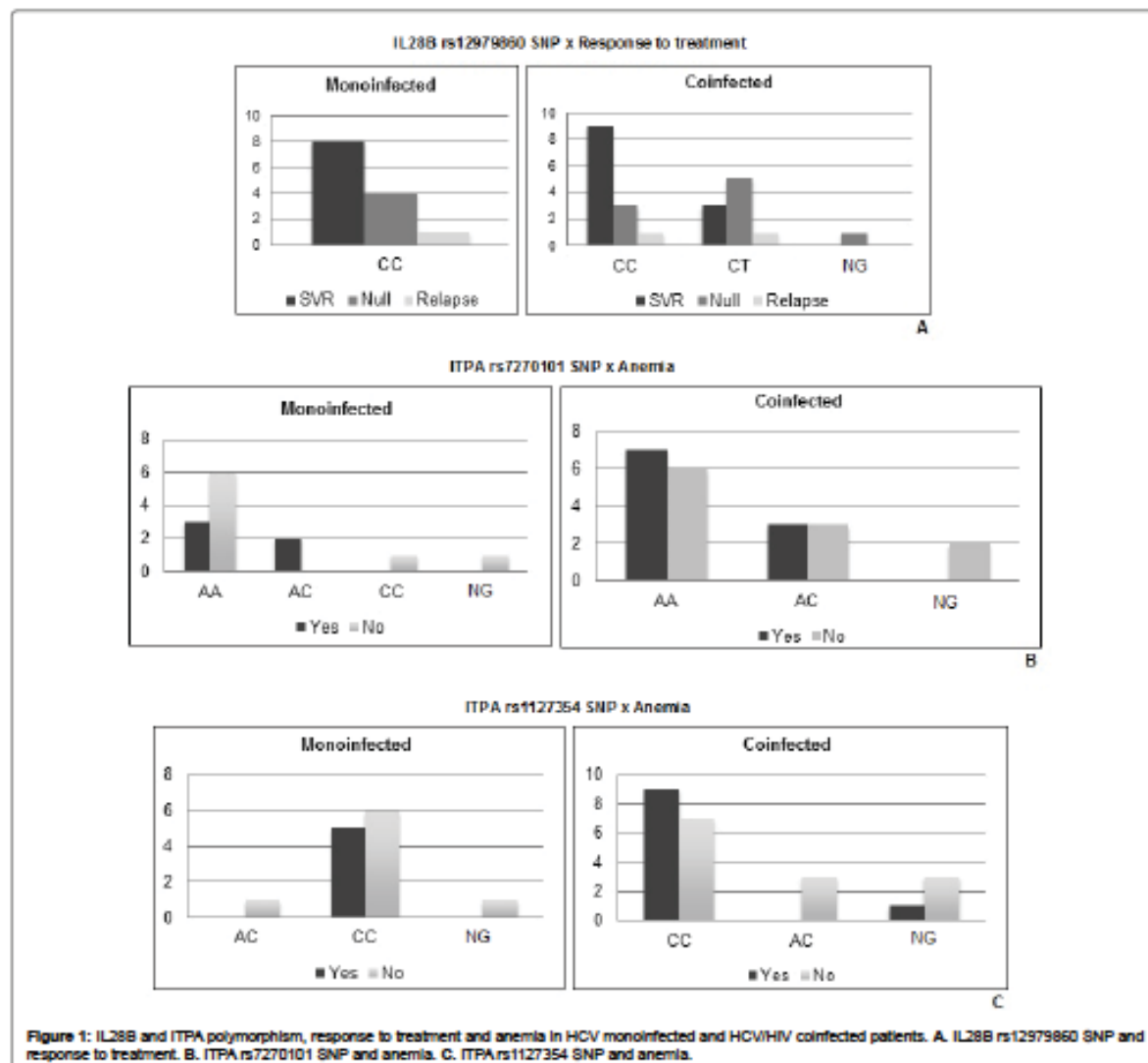
Discussion

The efficacy of PEG-IFN α /RBV treatment depends, in part, on the interaction of virus and host factors [13], and SNPs may be associated with the outcome and response to treatment, specially IL28B and ITPA genotypes have been reported to be significant markers in recent trials [14,15]. For IL28B SNPs, SVR rates were higher in CC patients (54% in mono-infected patients and 67% in coinfecting patients), findings similar to those reported in other studies [16-18]. Despite that, no significance was found, probably as a consequence of the small number of patients in both groups.

Characteristic	Mono-infected HCV (n=37)	Coinfected HCV/HIV-1 (n=41)	p-value
	N (%)	N (%)	
Gender			
Male	21 (57)	28 (68)	0.3515
Female	16 (43)	13 (32)	
Age (Years/Median/IQR)	54 (40-78)	49 (46-75)	0.3755
Hepatitis diagnosis time (Years/Median/IQR)	2 (1-21)	10 (7-23)	<0.0001
HCV genotype			
1	18 (49)	25 (61)	0.1306
3	15 (41)	9 (22)	
Other ¹	0	2 (5)	
NG	4 (10)	5 (12)	
HCV therapy			
Yes	13 (35)	23 (56)	0.0733
PEG/RB	12 (92)	23 (100)	
Other ²	1 (8)	0	
No	24 (65)	18 (44)	
HIV-1 diagnosis time (Years/Median/IQR)	-	15 (11-25)	-
ART use		41 (100)	-
HIV-1 viral load			
Detectable (>40 copies/mL)	-	9 (22.0)	-
Undetectable (<40 copies/mL)	-	32 (78.0)	-
CD4+ LT value (cells/mm ³ median/IQR)			
Nadir	-	149 (83-445)	-
Current	-	447 (290-1038)	-

IQR: Interquartile Range; NI: Not Informed; NG: Not Genotyped; Other¹: Genotyping 2 And 4; Other²: Simeprevir/Sofosbuvir; ART: Antiretroviral Therapy; In Bold: Significant Difference

Table 1: Demographics, clinical and virological data of the study population.



rs 7270101	rs 1127354	Predicted ITPase Activity (%)	Predicted ITPase Deficiency	HCV	Anemia (%)	HCV/HIV	Anemia (%)
AA	CC	100	-	7	3 (43)	12	7 (58)
AC	CC	60	+	3	2 (67)	5	2 (40)
AA	CA	30	++	1	0	2	0
CC	CC	30	++	1	0	0	0
AC	CA	10	+++	0	0	0	0
AA	AA	<5	+++	0	0	0	0

Note: Definition of an ITPase deficiency is variable according to rs7270101/rs1127354 genotypes: severity of ITPase deficiency was predicted as absent, representing wild-type activity (-), mild (+), moderate (++) or severe (+++) deficiency, according to previously study (31)

Table 2: Distribution of predicted ITPase activity according to compound genotype of rs7270101 and rs1127354 as previously determined by biochemical analyses in monoinfected (HCV) and coinfecting (HCV/HIV) patients.

Previously, Bertol et al. [19] evaluated the frequency of CC genotype in Southern Brazil, it was found in 31% of HCV monoinfected and 23.5% of HIV/HCV patients. SVR was not evaluated.

It has been suggested that SNPs close to the IL28B gene have significant influence on the establishment of HCV infection in monoinfected patients, contributing to a better understanding of the

susceptibility, natural history of HCV infection, and high rate of SRV in this patient group [16]. However, in the setting of HIV infection, Martin et al. [20] and Nattermann et al. did not find any correlation between the SNP rs12979860 and HIV mono-infected patients; there was no significant difference in the susceptibility to HIV infection, disease progression, or the clinical and laboratory parameters, such as viral load. Therefore, SNPs of the IL28B gene seem to be associated with HIV patients only when they are coinfected with HCV [21].

The ITPA gene encodes inosine triphosphate (ITPase) that catalyzes the conversion of inosine triphosphate (ITP) to inosine monophosphate (IMP) and pyrophosphate (Pi), and thus the ITP does not accumulate in normal cells. ITP is used to keep the adenosine triphosphate (ATP) in red blood cells, consequently preventing oxidative stress. The ITPase deficiency interrupts this cycle, leading to an accumulation of ITP in cells [22,23]. The RBV is incorporated into erythrocytes, undergoing phosphorylation to its pharmacologically active form through adenosine kinase. The ribavirin triphosphate is unable to cross the cell membrane of erythrocytes and accumulates intracellularly, thus causing oxidative damage and leading to hemolysis [24]. The ITPase deficiency causes the ITP accumulation in erythrocytes that can compete with RBV triphosphate, consequently protecting the RBV-induced hemolysis [25-27].

ITPase activity modulates the association between RBV and hemolysis, but there is no correlation with hemoglobin (Hb) decline, which has no impact on treatment response. Models suggest that ITPase activity has no direct influence on treatment response. The data confirm the strong protective effect of ITPase deficiency against Hb decline during PEG-IFN α /RBV treatment. Furthermore, ITPase deficiency was associated with a higher cumulative RBV dosage, and yet was not associated with SVR [28].

In this study, all patients treated and genotyped for ITPA SNPs had at least one favorable genotype for the development of anemia. Among mono-infected patients, 42% had anemia caused by ribavirin and 45% of coinfected patients presented this event. In a study performed by Delvaux et al. [29] in Brazilian patients with HCV, the allelic distribution frequency of SNPs in rs7270101 and rs1127354 showed high rates of AA and CC genotypes, respectively, suggesting that the study population are greatly prone to develop RBV-induced anemia. To our knowledge, this is the first report of the frequency of ITPA gene polymorphisms in a cohort of Brazilian patients coinfected with HCV/HIV. In HIV-1 infected adults on stable, contemporary ART, the prevalence of anemia was high [30] and in patients coinfected with HCV in RBV anemia may be more severe.

Because of the small number of study participants, it was not possible to evaluate the impact of SNPs in response to treatment of HCV. Besides that, studies about the SNP related to the response and toxicity to treatment in Brazil is recent. Similar to previous studies, they should be recommended in pretreatment period, when results could benefit not only the patients but also the public healthcare system, guiding the rational use of drugs in situations where treatment response rates are particularly low and adverse effects are high.

References

- Kuehikamp VM, Schuelter-Trevisol F (2013) Prevalence of human immunodeficiency virus/hepatitis C virus co-infection in Brazil and associated factors: A review. *Brazilian J Infect Dis* 17: 455-463.
- Ragni MV, Belle SH (2001) Impact of human immunodeficiency virus infection on progression to end-stage liver disease in individuals with Hemophilia and Hepatitis C Virus infection. *J Infect Dis* 183: 1112-1115.
- Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V, Charlotte F, Azria F, et al. (1999) Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfected patients. The Multivirc Group. *Hepatology* 30: 1054-1058.
- Rockstroh JK, Mocroft A, Soriano V, Tural C, Losso MH, et al. (2005) Influence of hepatitis C virus infection on HIV-1 disease progression and response to highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 192: 992-1002.
- CONITEC (2015) Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite C e coinfeções. Programa Nacional de DST/Aids, Ministério da Saúde - Dep DST, Aids e Hepatites Virais, Brazil.
- Strahotin GS, Babich M (2012) Hepatitis C variability, patterns of resistance and impact on therapy. *Adv Virol* 267483.
- Estrabaud E, Appourchaux K, Bléche I, Carat F, Lapalus M, et al. (2015) IFI35, mir-99a and HCV genotype to predict sustained virological response to pegylated-interferon plus ribavirin in chronic hepatitis C. *PLoS One* 10: e0121395.
- Fellay J, Thompson AJ, Ge D, Gumbs CE, Urban TJ, et al. (2010) ITPA gene variants protect against anaemia in patients treated for chronic hepatitis C. *Nature* 464: 405-408.
- Akuta N, Sezaki H, Suzuki F, Fujiyama S, Kawamura Y, et al. (2016) Retreatment efficacy and predictors of ledipasvir plus sofosbuvir to HCV genotype 1 in Japan. *J Med Virol*.
- Ferreira Cda S, Abreu RM, da Silva MC, Ferreira AS, Nasser PD, et al. (2013) A fast and cost-effective method for identifying a polymorphism of interleukin 28B related to hepatitis C. *PLoS One* 8: e78142.
- Thompson AJ, Fellay J, Patel K, Tillmann HL, Naggle S, et al. (2010) Variants in the ITPA gene protect against ribavirin-induced hemolytic anemia and decrease the need for ribavirin dose reduction. *Gastroenterology* 139: 1181-1189.
- Thompson AJ, Santoro R, Piazzola V, Clark PJ, Naggle S, et al. (2011) Inosine triphosphatase genetic variants are protective against anemia during antiviral therapy for HCV2/3 but do not decrease dose reductions of RBV or increase SVR. *Hepatology* 53: 389-395.
- Imran M, Manzoor S, Ashraf J, Khalid M, Tariq M, et al. (2013) Role of viral and host factors in interferon based therapy of hepatitis C virus infection. *Virol J* 10: 299.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, et al. (2009) Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461: 399-401.
- Fellay J, Thompson AJ, Ge D, Gumbs CE, Urban TJ, et al. (2010) ITPA gene variants protect against anaemia in patients treated for chronic hepatitis C. *Nature* 464: 405-408.
- Firdaus R, Biswas A, Saha K, Mukherjee A, Chaudhuri S, et al. (2014) Impact of host IL28B rs12979860, rs8099917 in interferon responsiveness and advanced liver disease in chronic genotype 3 hepatitis C patients. *PLoS One* 9: e99126.
- De Nicola S, Aghemo A, Grazia Rumi M, Galmozzi E, Valentini L, et al. (2012) Interleukin 28B polymorphism predicts pegylated interferon plus ribavirin treatment outcome in chronic hepatitis C genotype 4. *Hepatology* 55: 336-342.
- Supplah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, et al. (2009) IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 41: 1100-1104.
- Bertol BC, Moreira S, Garcia RF, Ferreira LE, Debortoli G, et al. (2015) IL28B gene polymorphisms in mono- and HIV-coinfected chronic hepatitis C patients. *Front Microbiol* 6: 153.
- Martin MP, Qi Y, Goedert JJ, Hussain SK, Kirk GD, et al. (2010) IL28B polymorphism does not determine outcomes of hepatitis B virus or HIV infection. *J Infect Dis* 202: 1749-1753.
- Nattermann J, Vogel M, Nischalke HD, Danta M, Mauss S, et al. (2011) Genetic Variation in IL28B and Treatment-Induced Clearance of Hepatitis C Virus in HIV-Positive Patients With Acute and Chronic Hepatitis C. *J Infect Dis* 203: 595-601.
- Cao H, Hegde RA (2002) DNA polymorphisms in ITPA including basis of inosine triphosphatase deficiency. *J Hum Genet* 47: 620-622.
- Maeda T, Sumi S, Ueta A, Ohkubo Y, Ito T, Marinko AM, et al. (2005) Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in the Japanese population. *Mol Genet Metab* 85: 271-279.

24. Keffe EB, Kowdley KV (2005) Hematologic side effects of interferon and ribavirin therapy. *J Clin Gastroenterol* 39: S3-S8.
25. Shapkova M, Lorenz K, Oellerich M, Wieland E, von Ahsen N (2006) Measurement of erythrocyte inosine triphosphate pyrophosphohydrolase (ITPA) activity by HPLC and correlation of ITPA genotype-phenotype in a Caucasian population. *Clin Chem* 52: 240-247.
26. Sakamoto N, Tanaka Y, Nakagawa M, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, et al. (2010) ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon- α and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C. *Hepato Res* 40: 1063-1071.
27. Kim JS, Ahn SM, Jung YK, Kwon OS, Kim YS, et al. (2013) The impact of inosine triphosphatase variants on hemoglobin level and sustained virologic response of chronic hepatitis C in Korean. *J Korean Med Sci* 28: 1213-1219.
28. Holmes JA, Roberts SK, Ali RJ, Dore GJ, Slevert W, et al. (2014) ITPA genotype protects against anemia during peginterferon and ribavirin therapy but does not influence virological response. *Hepatology* 59: 2152-2160.
29. Delvaux N, Costa VD Da, Costa MM Da, Villar LM, Coelho HSM, et al. (2015) inosine triphosphatase allele frequency and association with ribavirin-induced anaemia in Brazilian patients receiving antiviral therapy for chronic hepatitis C. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110: 636-643.
30. Lipshutz HM, Hileman CO, Ahuja S, Funderburg NT, McCormsey GA (2015) Anaemia is associated with monocyte activation in HIV-infected adults on antiretroviral therapy. *Antivir Ther* 20: S21-S27.

Citation: Avarzi VM, Vicente BA, Gomes-da-Silva MM, Vidal LRR, Nogueira MB, et al. (2016) IL28B and ITPA Single Nucleotide Polymorphisms in a Cohort of Patients with HCV and HCV/HIV, Southern Brazil. *J AIDS Clin Res* 7: 610. doi: [10.4172/2155-6113.1000610](https://doi.org/10.4172/2155-6113.1000610)

OMICS International: Publication Benefits & Features

Unique features:

- Increased global visibility of articles through worldwide distribution and indexing
- Showcasing recent research output in a timely and updated manner
- Special issues on the current trends of scientific research

Special features:

- 700+ Open Access Journals
- 50,000+ editorial team
- Rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing on major indexing services
- Sharing Option: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at <http://www.omicsonline.org/submit>

22 **ABSTRACT**

23 Pathogenic mechanisms of rapid progression of liver injury in HIV/HCV coinfection are
24 incompletely understood. Liver disease development is variable between individuals
25 having similar risk factors, suggesting that intensity of the inflammatory process is an
26 important contributor. In this study, we evaluated a series case of HCV or HIV
27 monoinfected and HCV/HIV coinfecting patients according to levels of IL-8 and IP-10,
28 and correlated with liver damage evolution. Clinical and epidemiological data were
29 reviewed from medical records. A total of 30 individuals with HCV mono-infection, 37
30 with HIV/HCV coinfection, 38 HIV mono-infection and 11 healthy controls were
31 included. Most HCV and HCV/HIV patients were male and the median age was 56.5
32 years, and 48 years respectively. All patients studied had a long time of HIV infection,
33 with 15 years median time. Patients HCV monoinfected and HCV/HIV coinfecting have
34 higher levels of IL-8 and IP-10 than HIV monoinfected and control group, suggesting that
35 HCV has the greatest ability to activate the system than HIV. Knowing the mechanisms
36 associated to inflammatory process pathogenesis triggered by viral infection will enable
37 these chemokines use as a prognostic factor, as well as possible targets in patients with
38 advanced liver disease.

39 **KEY WORDS** HCV, HIV, coinfection, IL-8, IP-10

41 **INTRODUCTION**

42 Worldwide, about 71 million people have chronic hepatitis C infection, a significant
43 number of those will develop cirrhosis or hepatocellular carcinoma (HCC), and
44 approximately 399.000 people die yearly from these complications. Currently,
45 hepatitis C treatments are made up of a combination of direct-acting antivirals
46 (DAAs), which can cure more than 95% of cases, thereby reducing the risk of death
47 from liver cancer and cirrhosis, nonetheless access to diagnosis and treatment is still
48 low (1).

49 HIV/HCV coinfection is quite common, occurring in 20-30% of the cases (2), and
50 success of combination antiretroviral therapy (ART) has made chronic hepatitis C
51 (CHC) an important comorbidity and a major cause of death in coinfecting patients (3,
52 4).

53 Additionally, HIV infection modifies the natural history of CHC in HIV/HCV-
54 coinfecting patients, with a higher probability of liver fibrosis progression, cirrhosis,
55 and end-stage liver disease than in HCV monoinfected patients (5, 6). During HCV

and HIV infection, pro-inflammatory factors and cytokine dysregulation may play a potential pro-fibrotic role, that could differ in both HCV monoinfected and HIV/HCV coinfecting subjects, especially when setting suppressed HIV replication on ART (4). Besides that, chronic inflammation and immune activation, as measured by concentrations of circulating inflammatory biomarkers, such cytokines and chemokines, are also associated with increased risk of several chronic diseases, such as cancer, cardiovascular disease (CVD), diabetes, aids, kidney disease, and aging (7–15). Viruses interaction with chemokine systems may constitute a common strategy by which viruses take advantage of host protein expression and maintain their replication (16). A viral infectious cycle may be required for IL-8 production by various types of human cells, such as in the case of HCV-infection (17). As well, in both intra-hepatic and peripheral levels of IP-10 are elevated in HCV-infected patients with intense liver inflammation and fibrosis (18, 19). High pre-treatment plasma IP-10 levels are found in chronically HCV-infected patients, who do not achieve sustained virological response (SVR) (20). This study has the aim to evaluate and characterize a group of patients HCV monoinfected and HCV/HIV coinfecting according to levels of IL-8 and IP-10 that may be contributing to the evolution of liver damage.

75

76 **RESULTS**

77 **Participant characteristics**

78 A total of 30 individuals with HCV infection and 37 with HIV / HCV coinfection were
79 included in the study. Moreover, we used a group of HIV mono-infected (n = 38) and a
80 healthy control group (n = 11). Among HCV and HCV / HIV individuals, the most were
81 male (20; 66.7%, and 25; 67.6 %, respectively), the median age was 56.5 years (IQR:
82 50.2 – 63.2y) and 48 years (IQR: 45 – 55y), respectively. In general, the patients included
83 in the study had a long time of HIV infection, with a median time of 15 years (IQR: 11 -
84 25 years). Regarding HCV infection, the lengths of diagnosis were 1 year (IQR: 1 – 4y)
85 and 10 years (6.3 – 11.8y) for mono and coinfecting patients, respectively. The background
86 characteristics of the study population and control group are summarized in Table 1.

87

88 Soluble Markers of Inflammation

89 Plasma IL-8 and IP-10 levels were evaluated in 37 coinfecting individuals with HIV/HCV,
 90 and compared with 30 monoinfected HCV, 38 monoinfected HIV and 11 healthy
 91 individuals (Fig. 1A and Fig. 1B). Comparing the groups, patients infected with HCV
 92 (mono and coinfecting with HIV) presented higher levels of IL-8 in the plasma compared
 93 to HIV infected ($p=0.0075$ and $p=0.0004$, respectively). Higher levels of IP-10 were
 94 found in HCV monoinfected patients (940.8 pg/mL, IQR 703.5 – 1508.0 pg/mL)
 95 compared to HIV infected patients ($p=0.0011$).

96 For a better age characterization, all participants were classified from 26 to 50 years and
 97 above 51 years old, and for the IP-10 levels, there was a significant difference between
 98 the two groups ($p=0.0144$) (Figure 2). There was no significant difference in the
 99 characterization of patients due to infection.

100 Regarding the HCV therapy based on pegylated interferon alpha and ribavirin (PEG-
 101 IFN α /RBV), a significant difference was found between the patients HCV monoinfected
 102 who developed SVR and non-SVR in relation to IL-8 and IP-10 levels ($p=0.0095$ and p
 103 $=0.0381$, respectively) (Figure 3A and 3B).

104 We did not observe correlation between the dosage of IL-8 and IP-10 with CD8+ T
 105 lymphocytes count ($r=-0.05244$, $p=0.05244$; $r=-0.006855$, $p=0.9708$ respectively). A
 106 positive correlation ($r=0.7375$; $p<0.0001$) was found when analyzing the IL-8 and IP-
 107 10 concentration in HCV / HIV-1 coinfecting patients (undetectable viral load) (Figure 4).
 108 No significance was observed when analyzing the IL28B genotype rs12979860 with the
 109 IL-8 and IP-10 levels. Moreover, There was no significance difference when comparing
 110 the APRI and FIB-4 scores with the levels of IL-8, and for IP-10 levels with the FIB-4
 111 scores between <1.45 and $1.46-3.24$, a significant difference was observed ($p=0.0149$)
 112 (Figure 5).

113

114 DISCUSSION

115 Despite the introduction of the DAAs into routine clinical practice, the PEG-IFN α and
 116 the RBV are likely to play important roles in the management of chronic HCV infection,
 117 and thus the responsiveness to PEG-IFN α /RBV therapy will remain important (21). In
 118 addition, other factors, as environmental and viral characteristics, may be implicated in
 119 liver disease progression, as well as information about host response to this viral injury
 120 might be useful in clinical practice (22).

121 In this study, we observed that patients with HCV are older than those with HIV, and a
122 more recent diagnosis of individuals infected with HCV. These situations can occur
123 because HIV typically has shorter latency until manifestation and is brought to clinical
124 attention sooner than HCV (23). The groups differed significantly by age at diagnosis,
125 patients infected with HIV-1 were notably younger, which may be associated with earlier
126 diagnoses among these subjects.

127 Similar to this study, previous reports have shown that HCV RNA levels in coinfecting
128 patients are higher than those in HCV monoinfected individuals (24, 25). Although the
129 detailed mechanism for the increase of HCV viral load in patients in ART use remains
130 unclear, it has been attributed to immune restoration after ART, which leads to an
131 increased CD4+ T-cell level and enhances immune response resulting in the destruction
132 of infected hepatocytes, and consequently, increasing HCV viral load (25).
133 Correspondingly, in this study, coinfecting patients had a lower median of CD4+ T-cell
134 count compared to HIV monoinfected patients.

135 HCV infection can impact the course of HIV infection via chronic immune activation and
136 cytokine production in HIV coinfecting individuals (26, 27), which can result in reduced
137 CD4+ T-cell counts (28). Furthermore, HCV among HIV-infected patients has also been
138 associated with increased CD4+ T-cell apoptosis (29) and high damage to the immune
139 system, which can subsequently increase viral replication of HIV and HCV, further
140 contributing to an impaired immune system and, consequently, lower CD4+ T-cell counts
141 than HIV+ monoinfected (30, 31). However, caution should be used in CD4+ T-cell count
142 interpretation because it may not truly reflect the HIV-infected patient's immunologic
143 status. Factors as leukopenia, medications, advanced liver disease, splenomegaly, viral
144 infections such as Epstein Barr virus, cytomegalovirus, human T-cell leukemia virus 1,
145 and bacterial infections such as tuberculosis can cause decrease of the absolute CD4+ T-
146 cell count (32).

147 During chronic HCV treatment, expression level of interferon-stimulated genes (ISGs) in
148 the liver is associated with the probability of achieving a SVR (33–35). Patients with high
149 baseline hepatic ISG expression have a lower chance of SVR with interferon-based
150 therapy.

151 IFN- γ -inducible protein-10 (IP-10, CXCL10) is a chemokine produced by a variety of
152 cells, including hepatocytes, attracting T-lymphocytes, natural killer cells and monocytes
153 (36). IP-10 is interferon-inducible and is produced by hepatocytes upon HCV infection
154 with circulating plasma IP-10 levels (37). High pre-treatment IP-10 levels are associated

155 with reduced rates of SVR during PEG-IFN/RBV treatment of chronic HCV (37–39) and
156 HCV/HIV coinfection (36, 37). Furthermore, when pre-treatment IP-10 levels are
157 combined with HCV genotype, the predictive value for discrimination between SVR and
158 non-response is improved, especially in those with unfavorable IL28B genotypes (21,
159 40).

160 In this study, patients with HCV (mono and/or coinfectd with HIV-1) had higher levels
161 of inflammation biomarkers (IL-8 and IP-10) than healthy controls and patients HIV
162 monoinfected. Patients with low baseline IP-10 levels (<150 pg/mL) were more likely to
163 achieve SVR than those with higher IP-10 levels, even after controlling for estimated
164 duration of infection and IL28B genotype. Beyond this early time-point, baseline IP-10
165 level and HCV RNA values were no longer predictive of treatment response (41).

166 The finding that IL28B variants primarily impact on the first phase of the HCV RNA
167 decline (42) as previously reported for IP-10 (43). This finding suggests that IL28B
168 rs12979860 and IP-10 are linked to the antiviral effectiveness of PEG-IFN α /RBV in the
169 blocking of the production or release of infectious virus rather than on the clearance of
170 HCV infected cells (21). However, no significance was observed when analyzing the
171 IL28B genotype rs12979860 with IL-8 and IP-10 levels.

172 IL-8 is a 71-amino acid pro-inflammatory chemokine that belongs to the CXC chemokine
173 family. IL-8 has been demonstrated to influence immune cells chemotaxis (44). Upon
174 receiving inflammatory stimuli, IL-8 can be up-regulated at the transcriptional level in
175 many different cell types, including fibroblasts, monocytes, and hepatocytes, for
176 protecting cells from the aberrant effects of inflammatory stimuli (45). In addition, IL-8
177 is an important inflammatory mediator in response to viral or bacterial pathogen (46).
178 Elevated IL-8 expression has been observed in HCV patients (47). Although correlations
179 between IL-8 production and SVR remain unclear, the IL-8 was considered a potential
180 biological marker in fibrosis scores and ALT levels (48). Even with a small number of
181 patients treated for HCV in the monoinfected group, a trend towards higher dosages of
182 inflammatory markers (IL-8 and IP-10) was observed in this study.

183 This study has some limitations. Certain aspects should be taken into account for the
184 correct interpretation of results, for example, this report has a cross-sectional design,
185 which can lead to a lack of uniformity, and the study has a limited number of patients in
186 some of study groups, which could limit the possibility of significance findings. In
187 addition, in HCV monoinfected patients group, few were treated, which makes difficult
188 a correct analysis treatment response. However, overall presented data suggested some

189 differences between IL-8 and IL-10 expression and liver damage. An increasing in the
 190 number of patients included would be needed to confirm these findings, and evaluating
 191 these biomarkers in HIV / HCV coinfection in different levels of liver damage, seeking
 192 to verify the readability of these markers use as prognostic factors, as well as possible
 193 targets in patients with advanced liver disease.

194 In conclusion, the plasma concentrations of IL-8 and IP-10 chemokines showed
 195 differences in comparison with groups of healthy and HIV monoinfected individuals and
 196 suggest that HCV patients are more likely to have their immune system activated.

197

198 MATERIAL AND METHODS

199 Study participants

200 A retrospective cohort study was conducted with HCV monoinfected and HIV/HCV co-
 201 infected patients from March 2011 to July 2016. These patients have been in clinical
 202 follow-up at Infectious Diseases Division at Hospital de Clínicas/Universidade Federal
 203 do Paraná (HC/UFPR), a tertiary care academic center from Curitiba, southern Brazil.
 204 Clinical and epidemiological findings as well as HIV/HCV genetic characterization, and
 205 IL28B SNP polymorphisms of these case series were previously reported (49, 50). The
 206 Institutional Review Board approved this study (IRB# 34716414.9.0000.0096) and all
 207 included patients provided written informed consent. Patients with incomplete medical
 208 records, children, and those who did not agree to participate in the study were excluded.
 209 Blood samples were obtained by standard venipuncture in ethylene diamine-tetra-acetic
 210 acid (EDTA) tubes; routine immunological (CD4+/CD8+ cell count) and molecular
 211 assays to assess HIV and HCV infections were performed. Plasma was separated and
 212 remained stored at -80°C, until the chemokine dosage tests. The genomic DNA was
 213 extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) separated on a
 214 Histopaque® 1077 (Sigma-Aldrich) gradient, using PureLink® Genomic DNA Mini Kit
 215 (Invitrogen CA, USA), according to the manufacturer's protocol, and stored at -20°C
 216 until the completion of genomic tests.

217 The CD4+ cells counts were quantified by flow cytometry (FACS Calibur - BD
 218 Biosciences, San Jose, CA). The HIV RNA levels in blood were quantified by branched
 219 DNA assay (Siemens) with limit of detection of 50 copies/mL and the HCV RNA in
 220 plasma was quantified by Artus HCV RG RT-PCR (Quiagen, Hilden, Germany),
 221 detection range 65 to 1,000,000 UI/mL. HCV genotyping by RealTime HCV Genotype

II Assay (Abbott, Illinois, USA) was performed at the Public Health Laboratory (LACEN-PR), Brazil.

Chemokine and Interleukin analysis

Plasma levels of the α -chemokine IL-8 and IP-10 were measured by Cytometric Bead Array (CBA), using the Human Chemokine Kit (BD Biosciences CA, USA), according to the manufacturer's protocol, using a FACSCanto™ II 4.2.2 (BD Biosciences CA, USA).

AST to Platelet Ratio Index (APRI) and Fibrosis-4 (FIB-4)

APRI and FIB-4 were calculated through the electronic health records system, according to the criteria previously established (51)(52). The APRI cut off for the correct identification of at least significant fibrosis ($F \geq 2$) is $APRI \geq 1.5$ (51). The FIB-4 score was developed to correctly identify advanced fibrosis ($F \geq 3$) in HIV/HCV-coinfected patients, and it is calculated with regard to age, platelet count, aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT). The FIB-4 cutoff for the correct identification of patients with at least advanced fibrosis ($F \geq 3$) is $FIB-4 \geq 3.25$ (53).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism® software version 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Continuous variables are represented as median values with interquartile ranges (IQR). Fisher's exact test or the χ^2 test was used to assess between-group differences, and the nonparametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test were used as appropriated. Correlations between laboratorial parameters were determined using the Spearman correlation test. All p-values are two-tailed, and a p-value of <0.05 was considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS

We have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

1. World Health Organization. 2017. Global hepatitis report, 2017.

- 256 2. 2016. HIV and AIDS - Annual Epidemiological Report 2016 21313.
- 257 3. Hernando V, Alejos B, Monge S, Berenguer J, Anta L, Vinuesa D, Palacios R,
258 Muga R, Moreno S, Jarrin I. 2013. All-cause mortality in the cohorts of the
259 Spanish AIDS Research Network (RIS) compared with the general population:
260 1997-2010. *BMC Infect Dis* 13:1.
- 261 4. Re V Lo, Kallan MJ, Tate JP, Localio AR, Lim JK, Goetz MB, Klein MB,
262 Rimland D, Rodriguez-Barradas MC, Butt AA, Gibert CL, Brown ST, Park L,
263 Dubrow R, Reddy KR, Kostman JR, Strom BL, Justice AC. 2014. Hepatic
264 decompensation in antiretroviral-treated patients co-infected with HIV and
265 hepatitis C virus compared with hepatitis C virus-monoinfected patients: A
266 cohort study. *Ann Intern Med* 160:369–379.
- 267 5. Lin W, Weinberg EM, Chung RT. 2013. Pathogenesis of accelerated fibrosis in
268 HIV/HCV co-infection. *J Infect Dis* 207:13–18.
- 269 6. Rivero-Juárez A, Camacho A, Merchante N, Pérez-Camacho I, Macias J, Ortiz-
270 Garcia C, Cifuentes C, Torre-Cisneros J, Peña J, Pineda J a., Rivero A. 2013.
271 Incidence of Liver Damage of Uncertain Origin in HIV Patients Not Co-Infected
272 with HCV/HBV. *PLoS One* 8:7–12.
- 273 7. Clendenen T, Lundin E. 2011. Circulating inflammation markers and risk of
274 epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol ...* 1–20.
- 275 8. Gu Y, Shore RE, Arslan AA, Koenig KL, Liu M, Ibrahim S, Lokshin AE,
276 Zeleniuch-Jacquotte A. 2010. Circulating cytokines and risk of B-cell non-
277 Hodgkin lymphoma: A prospective study. *Cancer Causes Control* 21:1323–1333.
- 278 9. Il'yasova D. 2005. Circulating Levels of Inflammatory Markers and Cancer Risk
279 in the Health Aging and Body Composition Cohort. *Cancer Epidemiol*
280 *Biomarkers Prev* 14:2413–2418.
- 281 10. Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, Ballantyne CM, Couper D, Vigo A,
282 Hoogeveen R, Folsom AR, Heiss G. 2003. Low-Grade Systemic Inflammation
283 and the Development of Type 2 Diabetes: The Atherosclerosis Risk in
284 Communities Study. *Diabetes* 52:1799–1805.
- 285 11. V Appay and D Sauce. 2008. Immune activation and inflammation in HIV-1
286 infection: causes and consequences. *J Pathol* 220:114–125.
- 287 12. Deeks SG. 2011. HIV Infection, Inflammation, Immunosenescence, and Aging.
288 *Annu Rev Med* 62:141–155.
- 289 13. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Jhangri GS, Curhan G. 2005. Biomarkers of

- inflammation and progression of chronic kidney disease. *Kidney Int* 68:237–245.
14. Hansson GK. 2005. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 352:1685–1695.
15. McKay HS, Bream JH, Margolick JB, Martinez-Maza O, Phair JP, Rinaldo CR, Abraham AG, Jacobson LP. 2016. Host factors associated with serologic inflammatory markers assessed using multiplex assays. *Cytokine* 85:71–79.
16. Khabar KS a, Polyak SJ. 2002. Hepatitis C virus-host interactions: the NS5A protein and the interferon/chemokine systems. *J Interferon Cytokine Res* 22:1005–12.
17. Polyak SJ, Khabar KSA, Rezeiq M, Gretch DR. 2001. Elevated Levels of Interleukin-8 in Serum Are Associated with Hepatitis C Virus Infection and Resistance to Interferon Therapy. *J Virol* 75:6209–6211.
18. Zeremski M, Petrovic LM, Chiriboga L, Brown QB, Yee HT, Kinkhabwala M, Jacobson IM, Dimova R, Markatou M, Talal AH. 2008. Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 48:1440–1450.
19. Zeremski M, Dimova R, Brown Q, Jacobson IM, Markatou M, Talal AH. 2009. Peripheral CXCR3-Associated Chemokines as Biomarkers of Fibrosis in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Infect Dis* 200:1774–1780.
20. Butera D, Marukian S, Iwamaye AE, Hembrador E, Chambers TJ, Di Bisceglie AM, Charles ED, Talal AH, Jacobson IM, Rice CM, Dustin LB. 2005. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood* 106:1175–1182.
21. Lagging M, Askarieh G, Negro F, Bibert S, Söderholm J, Westin J, Lindh M, Romero A, Missale G, Ferrari C, Neumann AU, Pawlotsky JM, Haagmans BL, Zeuzem S, Bochud PY, Hellstrand K. 2011. Response prediction in chronic hepatitis c by assessment of IP-10 and IL28B-related single nucleotide polymorphisms. *PLoS One* 6.
22. Medrano LM, Jimenez-Sousa MA, Fernandez-Rodriguez A, Resino S. 2017. Genetic Polymorphisms Associated with Liver Disease Progression in HIV/HCV-Coinfected Patients. *AIDS Rev* 19:3–15.
23. Raboni SM, Tuon FF, Beloto NCP, Demeneck H, Oliveira A, Largura D, Sagrado AG, Lima BP, Franzoni JP, Pedroso ML. 2014. Human immunodeficiency virus and hepatitis C virus/hepatitis B virus co-infection in

- 324 Southern Brazil: clinical and epidemiological evaluation. *Brazilian J Infect Dis*
 325 18:664–668.
- 326 24. Matthews-Greer JM, Caldito GC, Adley SD, Willis R, Mire AC, Jamison RM,
 327 McRae KL, King JW, Chang WL. 2001. Comparison of hepatitis C viral loads in
 328 patients with or without human immunodeficiency virus. *Clin Diagn Lab*
 329 *Immunol* 8:690–4.
- 330 25. Liu X, He N, Fu Z, Duan S, Gao M, Zhang ZF. 2012. Plasma hepatitis C virus
 331 viral load among hepatitis C virus mono-infected and HCV/HIV co-infected
 332 individuals in Yunnan Province, China. *Hepat Mon* 12:98–104.
- 333 26. Graham CS, Curry M, He Q, Afdhal N, Nunes D, Fleming C, Horsburgh R,
 334 Craven D, Sherman KE, Koziel MJ. 2004. Comparison of HCV-specific
 335 intrahepatic CD4+ T cells in HIV/HCV versus HCV. *Hepatology* 40:125–132.
- 336 27. Gonzalez VD, Falconer K, Blom KG, Reichard O, Morn B, Laursen AL, Weis N,
 337 Alaeus A, Sandberg JK. 2009. High Levels of Chronic Immune Activation in the
 338 T-Cell Compartments of Patients Coinfected with Hepatitis C Virus and Human
 339 Immunodeficiency Virus Type 1 and on Highly Active Antiretroviral Therapy
 340 Are Reverted by Alpha Interferon and Ribavirin Treatment. *J Virol* 83:11407–
 341 11411.
- 342 28. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Brecht B, Hagos E, Lampiris H, Deeks SG. 2003.
 343 T Cell Activation Is Associated with Lower CD4 + T Cell Gains in Human
 344 Immunodeficiency Virus – Infected Patients with Sustained Viral Suppression
 345 during Antiretroviral Therapy 94121.
- 346 29. Körner C, Krämer B, Schulte D, Coenen M, Mauss S, Fätkenheuer G, Oldenburg
 347 J, Nattermann J, Rockstroh JK, Spengler U. 2009. Effects of HCV co-infection
 348 on apoptosis of CD4+ T-cells in HIV-positive patients. *Clin Sci (Lond)* 116:861–
 349 870.
- 350 30. Adewole OO, Anteyi E, Ajuwon Z, Wada I, Elegba F, Ahmed P, Betiku Y, Okpe
 351 A, Eze S, Ogbeche T, Erhabor GE. 2009. Hepatitis B and C virus co-infection in
 352 Nigerian patients with HIV infection. *J Infect Dev Ctries* 3:369–375.
- 353 31. Netski DM, Mosbruger T, Astemborski J, Mehta SH, Thomas DL, Cox AL.
 354 2007. CD4 + T Cell–Dependent Reduction in Hepatitis C Virus–Specific
 355 Humoral Immune Responses after HIV Infection. *J Infect Dis* 195:857–863.
- 356 32. Li R GW. 2017. CD4 CountStatPearls Publishing.
- 357 33. McGilvray I, Feld JJ, Chen L, Pattullo V, Guindi M, Fischer S, Borozan I, Xie G,

- 358 Selzner N, Heathcote EJ, Siminovitch K. 2012. Hepatic cell-type specific gene
359 expression better predicts HCV treatment outcome than IL28B genotype.
360 *Gastroenterology* 142:1122–1131.e1.
- 361 34. Sarasin-Filipowicz M, Oakeley EJ, Duong FHT, Christen V, Terracciano L,
362 Filipowicz W, Heim MH. 2008. Interferon signaling and treatment outcome in
363 chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci* 105:7034–7039.
- 364 35. Feld JJ, Hoofnagle JH. 2005. Mechanism of action of interferon and ribavirin in
365 treatment of hepatitis C. *Nature* 436:967–972.
- 366 36. Zeremski M, Markatou M, Brown QB, Dorante G, Cunningham-Rundles S, Talal
367 AH. 2007. Interferon gamma-inducible protein 10: a predictive marker of
368 successful treatment response in hepatitis C virus/HIV-coinfected patients.
369 *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr* PAP.
- 370 37. Falconer K, Askarieh G, Weis N, Hellstrand K, Alaeus A, Lagging M. 2010. IP-
371 10 predicts the first phase decline of HCV RNA and overall viral response to
372 therapy in patients co-infected with chronic hepatitis C virus infection and HIV.
373 *Scand J Infect Dis* 42:896–901.
- 374 38. Romero AI, Lagging M, Westin J, Dhillon AP, Dustin LB, Pawlotsky J-M,
375 Neumann AU, Ferrari C, Missale G, Haagmans BL, Schalm SW, Zeuzem S,
376 Negro F, Verheij-Hart E, Hellstrand K. 2006. Interferon (IFN)- γ -inducible
377 protein-10: Association with histological results, viral kinetics, and outcome
378 during treatment with pegylated IFN- α 2a and ribavirin for chronic hepatitis C
379 virus infection. *J Infect Dis* 194:895–903.
- 380 39. Casrouge A, Decalf J, Ahloulay M, Lababidi C, Mansour H, Vallet-Pichard A,
381 Mallet V, Mottez E, Mapes J, Fontanet A, Pol S, Albert ML. 2011. Evidence for
382 an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected
383 with HCV. *J Clin Invest* 121:308–317.
- 384 40. Darling JM, Aerssens J, Fanning G, McHutchison JG, Goldstein DB, Thompson
385 AJ, Shianna K V., Afdhal NH, Hudson ML, Howell CD, Talloen W, Bollekens J,
386 De Wit M, Scholliers A, Fried MW. 2011. Quantitation of pretreatment serum
387 interferon- γ -inducible protein-10 improves the predictive value of an IL28B gene
388 polymorphism for hepatitis C treatment response. *Hepatology* 53:14–22.
- 389 41. Feld JJ, Grebely J, Matthews G V., Applegate T, Hellard M, Sherker A,
390 Cherepanov V, Petoumenos K, Yeung B, Kaldor JM, Lloyd AR, Dore GJ. 2013.
391 Plasma interferon-gamma-inducible protein-10 levels are associated with early,

- but not sustained virological response during treatment of acute or early chronic HCV infection. *PLoS One* 8.
42. Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, Shianna K V., Urban T, Afdhal NH, Jacobson IM, Esteban R, Poordad F, Lawitz EJ, McCone J, Shiffman ML, Galler GW, Lee WM, Reindollar R, King JW, Kwo PY, Ghalib RH, Freilich B, Nyberg LM, Zeuzem S, Poynard T, Vock DM, Pieper KS, Patel K, Tillmann HL, Noviello S, Koury K, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Goldstein DB, McHutchison JG. 2010. Interleukin-28B Polymorphism Improves Viral Kinetics and Is the Strongest Pretreatment Predictor of Sustained Virologic Response in Genotype 1 Hepatitis C Virus. *Gastroenterology* 139:120–129.e18.
 43. Gaudieri S, Rauch A, Pfafferoth K, Barnes E, Cheng W, McCaughan G, Shackel N, Jeffrey GP, Mollison L, Baker R, Furrer H, Günthard HF, Freitas E, Humphreys I, Klenerman P, Mallal S, James I, Roberts S, Nolan D, Lucas M. 2009. Hepatitis C virus drug resistance and immune-driven adaptations: Relevance to new antiviral therapy. *Hepatology* 49:1069–1082.
 44. Rossi G, Fortuna D, Pancotto L, Renzoni G, Taccini E, Ghiara P, Rappuoli R, Del Giudice G. 2000. Immunohistochemical study of lymphocyte populations infiltrating the gastric mucosa of beagle dogs experimentally infected with *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 68:4769–4772.
 45. Mukaida N. 2000. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol* 72:391–8.
 46. Pollicino T, Bellinghieri L, Restuccia A, Raffa G, Musolino C, Alibrandi A, Teti D, Raimondo G. 2013. Hepatitis B virus (HBV) induces the expression of interleukin-8 that in turn reduces HBV sensitivity to interferon-alpha. *Virology* 444:317–328.
 47. Elewa H, Abd-Elmeneem M, Hashem AM, Alshehaby A. 2010. Study of interleukin 8 (IL8) serum level in patients with chronic liver disease due to hepatitis C virus (HCV) with and without hepatocellular carcinoma (HCC). *Int J Hepatol* 1:9–17.
 48. Lee CM, Yen YH, Hung CH, Lu SN, Wang JH, Wang JC, Chen CH, Kee KM, Hu TH, Changchien CS. 2011. Liver interleukin-8 messenger RNA expression and interferon sensitivity-determining region mutations relate to treatment response in hepatitis C 1b. *Antivir Ther* 16:825–832.
 49. Avanzi VM, BA V, Silva MM G da, LRR V. 2016. IL28B and ITPA Single

- 426 Nucleotide Polymorphisms in a Cohort of Patients with HCV and HCV/HIV,
 427 Southern Brazil. *J AIDS Clin Res* 7.
- 428 50. Avanzi VM, Vicente BA, Beloto NCP, Gomes-Da-Silva MM, Ribeiro CEL,
 429 Tuon FF, Vidal LRR, Nogueira MB, Raboni SM. 2017. Profile of HIV subtypes
 430 in HIV/HBV- and HIV/HCVcoinfected patients in southern Brazil. *Rev Soc Bras*
 431 *Med Trop* 50:470–477.
- 432 51. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram
 433 HS, Lok ASF. 2003. A simple noninvasive index can predict both significant
 434 fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 38:518–
 435 526.
- 436 52. Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, Verkarre V, Nalpas A, Dhalluin-Venier V,
 437 Fontaine H, Pol S. 2007. FIB-4: An inexpensive and accurate marker of fibrosis
 438 in HCV infection. Comparison with liver biopsy and FibroTest. *Hepatology*
 439 46:32–36.
- 440 53. Sterling RK, Lissen E, Clumeck N, Sola R, Correa MC, Montaner J, Sulkowski
 441 MS, Torriani FJ, Dieterich DT, Thomas DL, Messinger D, Nelson M. 2006.
 442 Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in
 443 patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatology* 43:1317–1325.

Figure legends

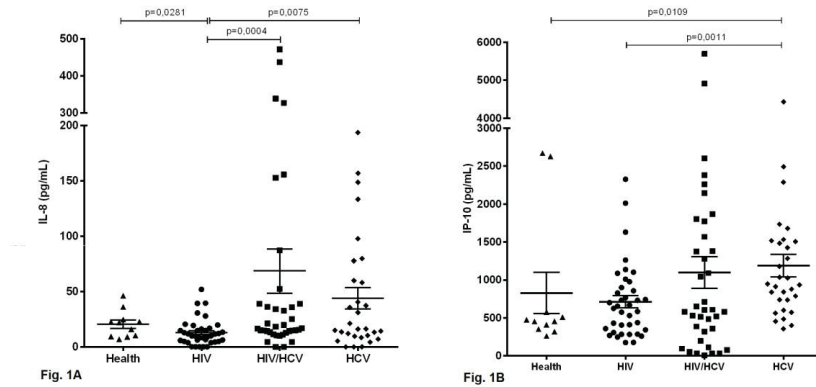


Figure 1. Plasma concentration of IL-8 (1A) and IP-10 (1B) in different groups of patients. The groups were analyzed two by two and the statistical values that are not in the figure were not statistically significant.

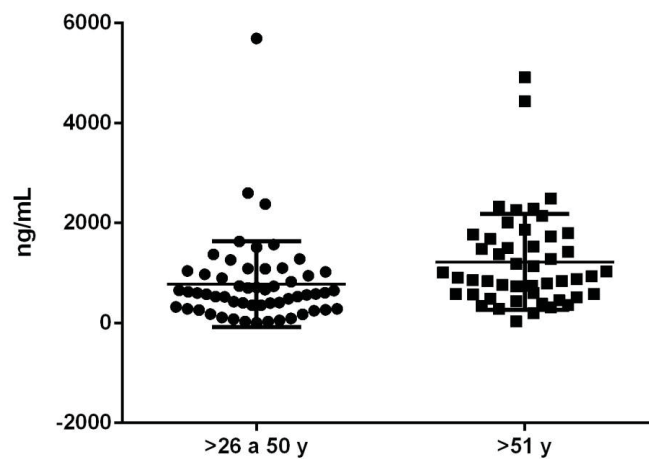


Figure 2. Dosage of IP-10 according to the according to the age classification in 26 to 50 years and above 51 years old.

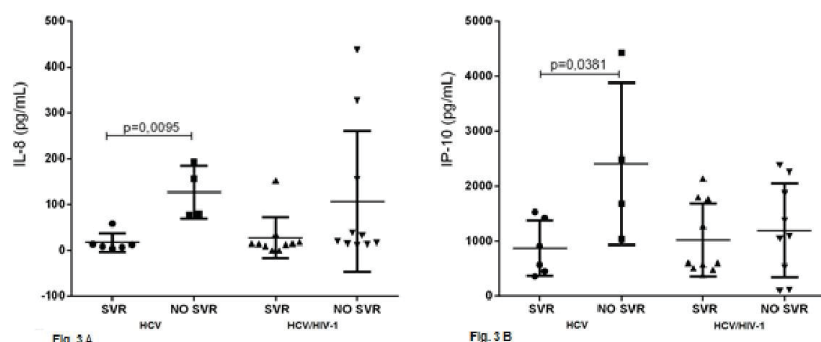


Figure 3. Dosage of IL-8 (Fig. 3A) and IP-10 (Fig. 3B) according to response to HCV therapy based on pegylated interferon alpha and ribavirin (PEG-IFN α /RBV) in patients monoinfected with HCV and coinfecting with HCV/HIV-1. The groups were analyzed two by two and the statistical values that are not in the figure were not statistically significant.

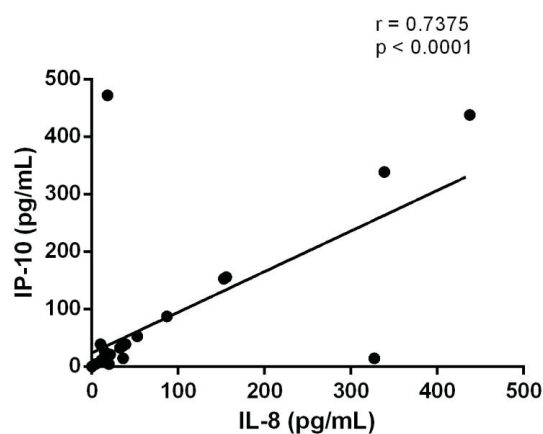


Figure 4. Correlation between IL-8 and IP-10 levels in patients coinfecting with HCV / HIV-1 who have undetectable HIV-1 viral load.

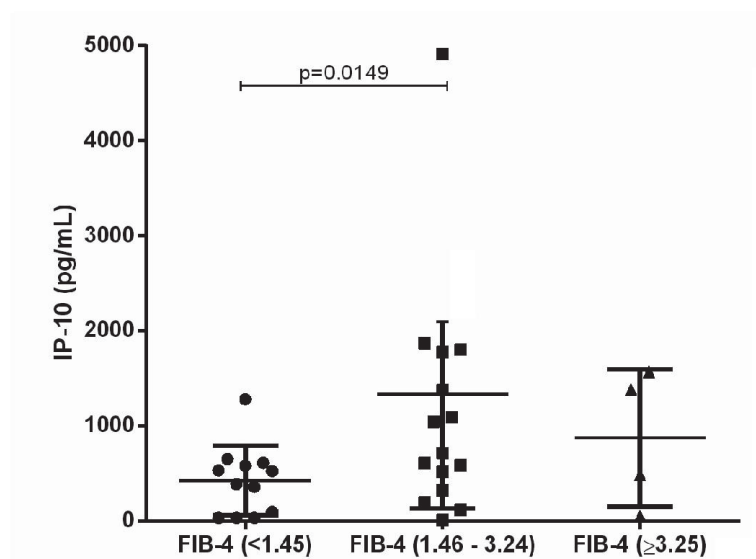


Figure 5. Levels of IP-10 according to the FIB-4 scores. The levels were analyzed two by two and the statistical values that are not in the figure were not statistically significant.

466 **Table**

467 **Table 1.** Clinical and epidemiological characteristics of healthy patients, HIV
 468 monoinfected, HIV / HCV coinfectd and HCV monoinfected individuals (N = 116).

Characteristics	Groups				p - value
	Health	HIV	HIV/HCV	HCV	
	(n = 11)	(n = 38)	(n = 37)	(n = 30)	
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
Gender					
Male	6 (54.6)	19 (50)	25 (67.6)	20 (66.7)	0.2390
Age, y [median (IQR)]	35 (28 – 36)	47.5 (43 - 51)	48 (45.5 - 55)	56.5 (50.2– 63.2)	< 0,0001
Hepatitis diagnosis length y [median (IQR)]	-	-	10 (6.3 - 11.8)	1 (1 - 4)	<0.0001
HCV viral load					
Undetectable (< 65 UI/mL)	-	-	10 (27)	7 (23.3)	1.000
Detectable (65 to 1,000,000 UI/mL)	-	-	23 (62.2)	19 (63.4)	
Median Log ₁₀ (IQR)			6.5 (6-6.9)	5.9 (5.5- 6.3)	0.0095
Not performed	-	-	4 (10.8)	4 (13.3)	
HCV genotype					
1	-	-	22 (59.5)	14 (47)	
3	-	-	8 (21.6)	14 (47)	0.0754
Other*	-	-	2 (5.4)	0	
Not performed	-	-	5 (13.5)	2 (6)	
Hepatitis therapy					
Yes	-	-	20 (54.1)	10 (33.3)	0.1379
HIV diagnosis length y [median(IQR)]	-	16 (14-17)	15 (11 – 25)	-	0.4259
HIV viral load					
Undetectable (<50 copies/mL)	-	28 (73.6)	29 (76.3)	-	0.7879
Detectable (>50 copies/mL)	-	10 (26.4)	8 (23.7)	-	
Median Log ₁₀ (IQR)		3.3 (2.7 – 4.5)	3.8 (1.7 – 4.3)		0.5182

CD4⁺ TL value
[(cells/mm³, median
(IQR)]

Nadir	-	141.5 (77 – 242.5)	149 (83 – 239)	-	0.4600
Current	-	611 (309 – 786.5)	398 (278 – 562)	-	0.0323

CD8⁺ TL value
[(cells/mm³, median
(IQR)]

Current	-	978,5 (695,5 – 1387)	924 (652 – 1116)	-	0.1787
---------	---	----------------------	------------------	---	--------

ART use

Yes	-	38 (100)	37 (100)	-	NA
-----	---	----------	----------	---	----

APRI	NA	NA	0.57 (0.33 – 1.38)	0.65 (0.45 – 1.56)	0.3843
-------------	----	----	--------------------	--------------------	--------

FIB-4	NA	NA	1.8 (1.3 – 2.5)	2.1 (1.2 – 4.1)	0.5327
--------------	----	----	-----------------	-----------------	--------

469 NA: Not Applicable. IRQ: interquartile range

5 CONCLUSÃO

- No trabalho que descreveu o perfil clínico e laboratorial dos pacientes coinfectados com HCV/HIV-1, foram avaliados 30 coinfectados com HCV/HIV-1. Os subtipos do HIV-1-1 identificados nas amostras dos indivíduos demonstram o perfil diferenciado dessa distribuição para a Região Sul do Brasil, sendo que 47,4% das amostras virais foram identificadas como subtipo C, e houve uma associação, entre as amostras avaliadas, do subtipo C com a transmissão heterossexual;
- No estudo que avaliou os polimorfismos dos genes da IL28B e ITPA, analisou-se um total de 37 pacientes monoinfectados com HCV e 41 coinfectados com HCV/HIV-1, destes, 3 (7%) foram a óbito, dois devido a complicações hepáticas.
- A avaliação do polimorfismo rs12979860 mostrou a presença do genótipo favorável C/C para o desenvolvimento de RVS em todos os pacientes monoinfectados pelo HCV e em 56,5% dos coinfectados.
- Em relação à anemia induzida pela ribavirina, todos os pacientes apresentaram o SNP do ITPA favorável para esse evento, e anemia estava presente em 38,5% dos infectados por monoinfecção e em 65,2% dos coinfectados.
- No terceiro trabalho, avaliou-se a quantificação de IL-8 e IP-10 em 30 indivíduos com monoinfecção por HCV, 37 coinfectados com HCV/HIV-1, 38 infectados pelo HIV-1 e 11 controles saudáveis.
- As concentrações plasmáticas das quimiocinas IL-8 e IP-10 mostraram diferenças na comparação com grupos de indivíduos saudáveis e monoinfectados com HIV e sugerem que os pacientes com HCV apresentam maior predisposição a ativar o sistema imune.

6 PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Este estudo apresenta algumas limitações, uma vez que certos aspectos devem ser levados em conta para a interpretação correta dos resultados, entre estes podem ser citados: apresenta um desenho transversal, o que pode levar a uma falta de uniformidade dos resultados; na vigência do estudo foram introduzidos a utilização dos DAA para todos os pacientes coinfectados, o que levou a inclusão de um número restrito de pacientes, limitando a possibilidade de encontrar significância dos resultados; por fim, no grupo de pacientes monoinfectados com HCV, poucos foram tratados, o que dificulta uma análise correta da resposta ao tratamento. No entanto, o presente trabalho direciona a continuidade de estudos com as amostras dos indivíduos coinfectados com HCV/HIV-1 para o sequenciamento e avaliação de outras regiões do genoma do HIV-1 não contemplados neste trabalho, bem como a avaliação de outros fatores que podem estar envolvidos no estado de ativação imune destes indivíduos, como a avaliação do perfil de ativação em células T e avaliação da translocação microbiana pela quantificação dos CD14 ou LPS e avaliação da dosagem de outras quimiocinas, buscando uma melhor compreensão dos processos imunopatogênicos envolvidos na coinfecção HCV/HIV-1, onde tal conhecimento poderá ter sua aplicabilidade em outras doenças infecciosas virais que atingem o fígado e para a qual não há tratamentos disponíveis.

7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Em decorrência desse estudo, foram produzidos artigos referentes aos indivíduos coinfectados com HCV/HIV-1, dois já se encontram publicados, o terceiro em fase de submissão e o quarto em fase de elaboração.

- AVANZI, V. M. et al. IL28B and ITPA Single Nucleotide Polymorphisms in a Cohort of Patients with HCV and HCV/HIV, Southern Brazil. *Journal of AIDS & Clinical Research*, v. 7, n. 9, 2016.
- AVANZI, V. M. et al. Profile of HIV subtypes in HIV/HBV- and HIV/HCVcoinfectad patients in southern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 50, n. 4, 2017.
- Interleukin-8 (IL-8) and interferon- γ -induced protein-10 (IP-10) chemokine as markers for evaluating HCV and HCV/HIV infection progression and monitoring therapy response. *Em fase de publicação*.
- IL-6, IL-8, IL10, CD4 and CD8 in liver tissue of patients coinfectad with HCV / HIV. *Em fase de elaboração*.

Outras publicações:

Participação em eventos científicos para divulgação dos resultados do projeto de pesquisa:

- 14th European Meeting on HIV & Hepatitis. HIV-1 subtype diversity, epidemiological, immunological and clinics profile of HIV/HCV co-infected patients, Southern Brazil, 2016.
- IX Simpósio Sul de Imunologia. Perfil epidemiológico, clínico e genético dos pacientes coinfectados com HIV/HCV atendidos em um hospital do sul do Brasil, 2016.
- 31st Clinical Virology Symposium. HIV Genetic variability and clinical/epidemiological profile of HIV/HCV co-infected patients in Southern Brazil, 2015.
- 8 Hepatoaids. Perfil clínico e epidemiológico dos pacientes coinfectados HIV/HCV atendidos em um hospital de referência no Sul do Brasil, 2015.

Capacitação de aluno em instituição fora do País

Para execução de parte deste estudo, foi realizado a capacitação técnica do aluno de doutorado do Programa de Pós-graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde no Laboratório de Referência e Investigação em Hepatites Virais – Unidade de Infecção Viral e Imunidade do Centro Nacional de Microbiologia - Instituto de Saúde Carlos III, Madrid, Espanha, no período de setembro de 2016 a janeiro 2017.

Captação de recursos (favor informar em R\$ recursos aprovados para projetos de pesquisa)

- Universal – MCTI/CNPq Nº 14/2014 – Faixa A
- Valor: R\$ 25.000,00

REFERÊNCIAS

- AFDHAL, Nezam H. et al. Epoetin Alfa Maintains Ribavirin Dose in HCV-Infected Patients: A Prospective, Double-Blind, Randomized Controlled Study. **Gastroenterology**, , v. 126, n. 5, p. 1302–1311, 2004.
- ALFREDO ALBERTI, Liliana Chemello and Luisa Benvegnù. Natural history of hepatitis C. **Journal of Hepatology**, , v. 31, n. Supplement 1, p. 17–24, 1999.
- AMBROSE, Zandrea; AIKEN, Christopher. HIV-1 uncoating: Connection to nuclear entry and regulation by host proteins. **Virology**, , v. 454–455, n. 1, p. 371–379, 2014.
- ANDERSEN, E. S. et al. Twelve potential fibrosis markers to differentiate mild liver fibrosis from cirrhosis in patients infected with chronic hepatitis C genotype 1. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 6, 2011. a.
- ANDERSEN, E. S. et al. Twelve potential fibrosis markers to differentiate mild liver fibrosis from cirrhosis in patients infected with chronic hepatitis C genotype 1. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 6, p. 761–766, 2011. b.
- ANDRADE JUNIOR, Dahir Ramos De; ANDRADE, Dahir Ramos De. The Influence of the Human Genome on Chronic Viral Hepatitis Outcome. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v. 46, n. 3, p. 119–126, 2004.
- ANTIRETROVIRAL THERAPY COHORT COLLABORATION. The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. **Lancet**, v. 372, n. 372, p. 293–299, 2008.
- ASSELAH, T. et al. Liver gene expression signature to predict response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. **Gut**, v. 57, n. 4, p. 516–523, 2008.
- ASSOCIATION, European. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. **Journal of Hepatology**, v. 63, n. 1, p. 199–236, 2015.
- BALAGOPAL, Ashwin et al. Human Immunodeficiency Virus-Related Microbial Translocation and Progression of Hepatitis C. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 226–233, 2008.
- BARRÉ-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). v. 220, 1983.
- BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 24, n. 2, p. 289–293, 1996.

BELLO, Gonzalo et al. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. **AIDS (London, England)**, v. 22, n. 15, p. 1993–2000, 2008.

BENITO, José Miguel et al. CD38 Expression on CD8+ T Lymphocytes as a Marker of Residual Virus Replication in Chronically HIV-Infected Patients Receiving Antiretroviral Therapy. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 20, n. 2, p. 227–233, 2004.

BENNETT, Diane E. et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, 2009.

BERENGUER, J. et al. Sustained virological response to interferon plus ribavirin reduces non-liver-related mortality in patients coinfectd with HIV and hepatitis C virus. **Clin Infect Dis**, v. 55, 2012. a.

BERENGUER, Juan et al. High plasma CXCL10 levels are associated with HCV-genotype 1, and higher insulin resistance, fibrosis, and HIV viral load in HIV/HCV coinfectd patients. **Cytokine**, v. 57, n. 1, p. 25–29, 2012. b.

BLACH, Sarah et al. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. **The Lancet Gastroenterology and Hepatology**, v. 2, n. 3, p. 161–176, 2017.

BLIGHT, K. et al. Immunohistochemical detection of the NS4 antigen of hepatitis C virus and its relation to histopathology. **Am J Pathol**, v. 143, n. 6, p. 1568–1573, 1993.

BRASIL. Manual técnico para o diagnóstico das hepatites virais. **Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil**, 2015.

BRASIL. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde. **Ministério da Saúde**, v. 48, 2017. a.

BRASIL. Hepatite C e coinfeções. 2017. b.

BRASIL. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Manejo da Infecção pelo HIV em adultos**, p. 416, 2017. c.

BRENCHLEY, Jason M. et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. **Nature medicine**, v. 12, n. 12, p. 1365–71, 2006.

BRONOWICKI, Jean Pierre et al. Effect of Ribavirin in Genotype 1 Patients With Hepatitis C Responding to Pegylated Interferon Alfa-2a Plus Ribavirin. **Gastroenterology**, v. 131, n. 4, p. 1040–1048, 2006.

BUSHMAN, Frederic D.; CRAIGIE, Robert. Host Factors in Retroviral Integration and the Selection of Integration Target Sites. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 6, p. 1–14, 2014.

- CAO, Henian; HEGELE, Robert A. DNA polymorphisms in ITPA including basis of inosine triphosphatase deficiency. **Journal of human genetics**, v. 47, n. 11, p. 620–2, 2002.
- CARVALHAES, Fernanda Andreza de Pinho Lott et al. Frequencies of CCR5-D32, CCR2-64I and SDF1-3'A mutations in Human Immunodeficiency Virus (HIV) seropositive subjects and seronegative individuals from the state of Pará in Brazilian Amazonia. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 665–669, 2005.
- CHOO, Q. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359–362, 1989.
- CINAMON, Guy et al. Novel chemokine functions in lymphocyte migration through vascular endothelium under shear flow. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, n. 6, p. 860–866, 2001.
- COTTE, Laurent et al. Hepatitis C treatment initiation in HIV-HCV coinfecting patients. **BMC Infectious Diseases**, p. 1–9, 2016.
- DE FRANCESCHI, Lucia et al. Hemolytic anemia induced by ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection: Role of membrane oxidative damage. **Hepatology**, v. 31, n. 4, p. 997–1004, 2000.
- DE OCA ARJONA, Montserrat Montes et al. Bacterial translocation in HIV-infected patients with HCV cirrhosis: Implication in hemodynamic alterations and mortality. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 56, n. 5, p. 420–427, 2011.
- DEEKS, Steven G.; TRACY, Russel; DOUEK, Daniel C. Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection. **Immunity**, v. 39, n. 4, p. 633–645, 2013.
- DEFORGES, Séverine et al. Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo. **The Journal of general virology**, v. 85, n. Pt 9, p. 2515–2523, 2004.
- DEL RIO, Richard A.; POST, Anthony B.; SINGER, Mendel E. Cost-effectiveness of hematologic growth factors for anemia occurring during hepatitis C combination therapy. **Hepatology**, v. 44, n. 6, p. 1598–1606, 2006.
- DELWART, E. L. et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. **Science**, v. 262, n. 5137, p. 1257–1261, 1993.
- DIRCHWOLF, Melisa et al. Immune dysfunction in cirrhosis: Distinct cytokines phenotypes according to cirrhosis severity. **Cytokine**, v. 77, p. 14–25, 2016.
- EASL. Recommendations on Treatment of Hepatitis C. **Journal of hepatology**, n. September, p. 1–23, 2016.
- FARCI, P.; PURCELL, R. H. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. **Seminars in liver disease**, v. 20, n. 1, p. 103–26, 2000.

FARKAS, Lorant et al. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- α/β -producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. **American Journal of Pathology**, v. 159, n. 1, p. 237–243, 2001.

FELD, Jordan J.; HOOFNAGLE, Jay H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 967–972, 2005.

FELLAY, Jacques et al. ITPA gene variants protect against anaemia in patients treated for chronic hepatitis C. **Nature**, v. 464, n. 7287, p. 405–408, 2010.

FERREIRA, Camila Da Silva et al. A Fast and Cost-Effective Method for Identifying a Polymorphism of Interleukin 28B Related to Hepatitis C. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e78142, 2013.

FERREIRA, Camila Da Silva. Pacientes portadores de hepatite C crônica e em controles sadios : nova metodologia de baixo custo e menor tempo para genotipagem. p. 131, 2013.

FORTON, Daniel M.; THOMAS, Howard C.; TAYLOR-ROBINSON, Simon D. Central nervous system involvement in hepatitis C virus infection. **Metabolic brain disease**, v. 19, n. 3–4, p. 383–91, 2004.

FRANKEL, Alan D.; YOUNG, John A. T. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 1–25, 1998.

FRENCH, Audrey L. et al. Microbial translocation and liver disease progression in women coinfectd with HIV and hepatitis C virus. **The Journal of infectious diseases**, v. 208, n. 4, p. 679–89, 2013.

FRIED, MV; SHIFFMAN, Mitchell L.; REDDY, KR. PEGINT E RF E RON ALFA - 2a PLUS RIBAV IRIN FOR H EPATITIS C PEGINTERFERON ALFA-2a PLUS RIBAVIRIN FOR CHRONIC HEPATITIS C VIRUS INFECTION. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 13, p. 975–982, 2002.

FUNDERBURG, Nicholas T. et al. Dynamics of immune reconstitution and activation markers in HIV+ treatment-naïve patients treated with raltegravir, tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–12, 2013.

GALLO, R. C. et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 500–3, 1984.

GASCHEN, Brian et al. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. **Science**, v. 296, n. 5577, p. 2354–2360, 2002.

GE, Dongliang et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. **Nature**, v. 461, n. 7262, p. 399–401, 2009.

GEIJTENBEEK, Teunis B. H. et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. **Cell**, v. 100, n. 5, p. 587–597, 2000.

GIFFORD, Robert J. et al. The calibrated population resistance tool: Standardized genotypic estimation of transmitted HIV-1 drug resistance. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1197–1198, 2009.

GOWER, Erin et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 1, p. S45–S57, 2014.

GRAHAM, C. S. et al. Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 33, n. 4, p. 562–9, 2001.

HADZIYANNIS, Stephanos J. Peginterferon- α 2a and Ribavirin Combination Therapy in Chronic Hepatitis C. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, n. 5, p. 346, 2004.

HAISSMAN, Judith M. et al. Plasma cytokine levels in Tanzanian HIV-1-infected adults and the effect of antiretroviral treatment. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 52, n. 4, p. 493–497, 2009.

HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT** Nucleic Acids Symposium Series, 1999.

HARVEY, Charles E. et al. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 74, p. 360–369, 2003.

HAWKINS, Claudia et al. High rates of hepatitis C virus (HCV) cure using direct-acting antivirals in HIV/HCV-coinfected patients: a real-world perspective. n. June, p. 2642–2645, 2016.

HEMANN, Emily A.; GALE, Michael; SAVAN, Ram. Interferon lambda genetics and biology in regulation of viral control. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. DEC, 2017.

HEMELAAR, Joris. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. **Trends in molecular medicine**, v. 18, n. 3, p. 182–92, 2012.

HODOWANEC, Aimee C. et al. A matched cross-sectional study of the association between circulating tissue factor activity, immune activation and advanced liver fibrosis in hepatitis C infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2015.

HONG, MeeAe et al. Interferon lambda 4 expression is suppressed by the host during viral infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 12, p. 2539–2552, 2016.

HOOFNAGLE, Jay H. et al. Early Changes in Hepatitis C Virus (HCV) Levels in Response to Peginterferon and Ribavirin Treatment in Patients with Chronic HCV Genotype 1 Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 8, p. 1112–1120, 2009.

HSU, Ching-Sheng et al. Factors affecting early viral load decline of Asian chronic hepatitis C patients receiving pegylated interferon plus ribavirin therapy. **Antiviral therapy**, v. 14, n. 1, p. 45–54, 2009.

HU, Wei-Shau; HUGHES, Stephen H. HIV-1 reverse transcription. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 10, p. a006882-, 2012.

IANNELLO, A. et al. Antiviral NK cell responses in HIV infection: II. viral strategies for evasion and lessons for immunotherapy and vaccination. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 1, p. 27–49, 2008.

IDREES, Muhammad; RIAZUDDIN, Sheikh. A study of best positive predictors for sustained virologic response to interferon alpha plus ribavirin therapy in naive chronic hepatitis C patients. **BMC Gastroenterology**, v. 9, p. 1–9, 2009.

IPP, Hayley et al. Role of inflammation in HIV-1 disease progression and prognosis. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 51, n. 2, p. 98–111, 2014.

JACOBSON BROWN, Pearl M.; NEUMAN, Manuela G. Immunopathogenesis of hepatitis C viral infection: Th1/Th2 responses and the role of cytokines. **Clinical Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 167–171, 2001.

JEANG, Kuan-Teh. Multi-Faceted Post-Transcriptional Functions of HIV-1 Rev. **Biology**, v. 1, n. 3, p. 165–174, 2012.

KEEFFE, Emmet B.; KOWDLEY, Kris V. Hematologic side effects of PEG interferon and ribavirin. Management with growth factors. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 39, n. 1 Suppl, p. S1–2, 2005.

KIM, Arthur Y.; CHUNG, Raymond T. Coinfection With HIV-1 and HCV—A One-Two Punch. **Gastroenterology**, v. 137, n. 3, p. 795–814, 2009. a.

KIM, Arthur Y.; CHUNG, Raymond T. Coinfection With HIV-1 and HCV—A One-Two Punch. **Gastroenterology**, v. 137, n. 3, p. 795–814, 2009. b.

KIM, Arthur Y.; CHUNG, Raymond T. Coinfection With HIV-1 and HCV—A One-Two Punch. **Gastroenterology**, v. 137, n. 3, p. 795–814, 2009. c.

KIM, Ju Seung et al. The impact of inosine triphosphatase variants on hemoglobin level and sustained virologic response of chronic hepatitis C in Korean. **Journal of Korean medical science**, v. 28, n. 8, p. 1213–9, 2013.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–20, 1980.

KOBAYASHI, M. et al. Antibody response to E2/NS1 hepatitis C virus protein in patients with acute hepatitis C. **Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 1, p. 73–76, 1997.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

KUO, G. et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 362–364, 1989.

LAMBOTIN, Mélanie et al. A look behind closed doors: Interaction of persistent viruses with dendritic cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 350–360, 2010.

LAMBOTIN, Mélanie et al. Challenges for HCV vaccine development in HIV-HCV coinfection. **Expert review of vaccines**, v. 11, n. 7, p. 791–804, 2012.

LAMPE, Elisabeth et al. Genetic diversity of HCV in Brazil. **Antiviral Therapy**, v. 18, n. 3 PARTB, p. 435–444, 2013.

LANGHANS, Bettina et al. Intrahepatic IL-8 producing Foxp3+CD4+ regulatory T cells and fibrogenesis in chronic hepatitis C. **Journal of Hepatology**, v. 59, n. 2, p. 229–235, 2013.

LEEANSYAH, Edwin et al. Soluble biomarkers of HIV transmission, disease progression and comorbidities. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 8, n. 2, p. 117–124, 2013.

LENGAUER, Thomas et al. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 1407–1410, 2007.

LI, Guangdi et al. An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective. **Retrovirology**, v. 12, p. 18, 2015.

LIN, Wenyu; WEINBERG, Ethan M.; CHUNG, Raymond T. Pathogenesis of accelerated fibrosis in HIV/HCV co-infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. SUPPL.1, p. 13–18, 2013.

LOLE, K. S. et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. **Journal of virology**, v. 73, n. 1, p. 152–160, 1999.

LOUSTAUD-RATTI, Véronique et al. Ribavirin exposure after the first dose is predictive of sustained virological response in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 47, n. 5, p. 1453–1461,

2008.

LYNCH, Shaina M.; WU, George Y. Hepatitis C Virus: A Review of Treatment Guidelines, Cost-effectiveness, and Access to Therapy. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 4, p. 310–319, 2016.

MAEDA, Tohru et al. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in the Japanese population. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 85, n. 4, p. 271–279, 2005.

MAHESHWARI, Anurag; RAY, Stuart; THULUVATH, Paul J. Acute hepatitis C. **Lancet (London, England)**, v. 372, n. 9635, p. 321–32, 2008.

MANNS, M. P. et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. **Lancet**, v. 358, n. 9286, p. 958–965, 2001.

MARKOWITZ, Martin et al. Chronic Hepatitis C Virus Infection and the Proinflammatory Effects of Injection Drug Use. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 9, p. 1376–1382, 2016.

MÁRQUEZ, Mercedes et al. Immune activation response in chronic HIV-infected patients: Influence of hepatitis C virus coinfection. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 2015.

MÁRQUEZ, Mercedes; FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ DEL ÁLAMO, Clotilde; GIRÓN-GONZÁLEZ, José Antonio. Gut epithelial barrier dysfunction in human immunodeficiency virus-hepatitis C virus coinfecting patients: Influence on innate and acquired immunity. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 4, p. 1433–1448, 2016.

MARRA, Fabio; TACKE, Frank. Roles for chemokines in liver disease. **Gastroenterology**, v. 147, n. 3, p. 577–594.e1, 2014.

MARTÍNEZ-ESPARZA, María et al. Inflammatory status in human hepatic cirrhosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 41, p. 11522–11541, 2015.

MARTINOT-PEIGNOUX, M. et al. Optimal pretreatment viral load cut-off to predict treatment outcome in patients with chronic hepatitis C treated with peginterferon a-2b plus ribavirin. **Journal of Hepatology**, v. 46, p. S234, 2007.

MARTINOT-PEIGNOUX, Michelle et al. Twelve weeks posttreatment follow-up is as relevant as 24 weeks to determine the sustained virologic response in patients with hepatitis C virus receiving pegylated interferon and ribavirin. **Hepatology**, v. 51, n. 4, p. 1122–1126, 2010.

MARTINS, Tatiana; NARCISO-SCHIAVON, Janaína Luz; SCHIAVON, Leonardo De Lucca. [Epidemiology of hepatitis C virus infection]. **Revista da Associação Médica Brasileira (1992)**, v. 57, n. 48, p. 107–12, 2011.

MAYLIN, Sarah et al. Sustained virological response is associated with clearance of hepatitis C virus RNA and a decrease in hepatitis C virus antibody. **Liver International**, v. 29, n. 4, p. 511–517, 2009.

MBONYE, Uri; KARN, Jonathan. Transcriptional control of HIV latency: Cellular signaling pathways, epigenetics, happenstance and the hope for a cure. **Virology**, v. 454–455, n. 1, p. 328–339, 2014.

MCHUTCHISON, John G. et al. Interferon Alfa-2b Alone or in Combination with Ribavirin as Initial Treatment for Chronic Hepatitis C. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 21, p. 1485–1492, 1998.

MCHUTCHISON, John G. et al. Peginterferon Alfa-2b or Alfa-2a with Ribavirin for Treatment of Hepatitis C Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 6, p. 580–593, 2009.

MEDRANO, Luz Maria et al. **Elevated liver stiffness is linked to increased biomarkers of inflammation and immune activation in HIV/HCV-coinfected patients.** [s.l: s.n.].

MEISSNER, Eric G. et al. Rapid changes in peripheral lymphocyte concentrations during interferon-free treatment of chronic hepatitis C virus infection. **Hepatology Communications**, v. 1, n. 7, p. 586–594, 2017.

MESSINA, Jane P. et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 77–87, 2015.

MICHAEL, N. L. et al. The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. **Nature medicine**, v. 3, n. 3, p. 338–40, 1997.

MODI, A. A.; LIANG, T. J. Hepatitis C: A clinical review. **Oral Diseases**, v. 14, n. 1, p. 10–14, 2008.

MOHANDAS, T. et al. Regional mapping of ada and itp on human chromosome 20: Cytogenetic and somatic cell studies in an x/20 translocation. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 26, n. 1, p. 28–35, 1980.

MUNIR, Saira et al. Hepatitis C Treatment: Current and future perspectives. **Virology Journal**, v. 7, n. 1, p. 296, 2010.

MYRMEL H, ULVESTAD E, Asjo B. The hepatitis C virus enigma. **APMIS**, v. 117, p. 427–439, 2009.

NETSKI, Dale M. et al. CD4⁺ T Cell–Dependent Reduction in Hepatitis C Virus–Specific Humoral Immune Responses after HIV Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 6, p. 857–863, 2007.

NEUMANN-HAEFELIN, C. et al. T cell response in hepatitis C virus infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. 2, p. 75–85, 2005.

NOEL, Nicolas et al. Long-Term Spontaneous Control of HIV-1 Is Related to Low Frequency of Infected Cells and Inefficient Viral Reactivation. **Journal of Virology**, v. 90, n. 13, p. 6148–6158, 2016.

OO, Ye Htun et al. CXCR3-dependent recruitment and CCR6-mediated positioning of Th-17 cells in the inflamed liver. **Journal of Hepatology**, v. 57, n. 5, p. 1044–1051, 2012.

PARISE, EDISON R.; STRAUSS, EDNA; CHEINQUER, Hugo. Consenso sobre Hepatite C Crônica da Sociedade Brasileira de Hepatologia. **Consenso sobre Hepatite crônica**, 2014.

PASARIN, Marcos et al. Intrahepatic vascular changes in non-alcoholic fatty liver disease: Potential role of insulin-resistance and endothelial dysfunction. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 37, p. 6777–6787, 2017.

PATEL, Keyur et al. Multiplex protein analysis to determine fibrosis stage and progression in patients with chronic hepatitis C. **Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association**, v. 12, n. 12, p. 2113–20.e1–3, 2014.

PAWLOTSKY, Jean Michel et al. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C. **Journal of Hepatology**, v. 63, n. 1, p. 199–236, 2015.

PERELSON, A. S. et al. HIV-1 Dynamics in Vivo: Virion Clearance Rate, Infected Cell Life-Span, and Viral Generation Time. **Science**, v. 271, n. 5255, p. 1582–1586, 1996.

PETERS, Lars et al. Biomarkers of inflammation, coagulation and microbial translocation in HIV/HCV co-infected patients in the SMART study. **Journal of Clinical Virology**, v. 60, n. 3, p. 295–300, 2014.

PETRUZZIELLO, Arnolfo et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An update of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 34, p. 7824–7840, 2016.

PHILPOTT, Sean. HIV-1 Coreceptor Usage, Transmission, and Disease Progression. **Current HIV Research**, v. 1, n. 2, p. 217–227, 2003.

PILCHER, Christopher D. et al. Review series Acute HIV revisited : new opportunities for treatment and prevention. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 7, p. 937–945, 2004.

POYNARD, Thierry et al. Randomised trial of interferon α 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon α 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. **The Lancet**, v. 352, n. 9138, p. 1426–1432, 1998.

POYNARD, Thierry et al. Biomarkers of liver fibrosis. **Advances in clinical chemistry**, v. 46, p. 131–60, 2008.

POYNARD, Thierry et al. Peginterferon alfa-2b and Ribavirin: Effective in Patients With Hepatitis C Who Failed Interferon alfa/Ribavirin Therapy. **Gastroenterology**, v. 136, n. 5, p. 1618- 1628.e2, 2009.

PRINCE, A. M. et al. Immunity in hepatitis C infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 165, n. 3, p. 438–43, 1992.

PROKUNINA-OLSSON, Ludmila et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. **Nature Genetics**, v. 45, n. 2, p. 164–171, 2013.

QUEREDA, Carmen et al. The natural history of liver cirrhosis in HIV – hepatitis C virus-coinfected patients. n. February, 2011.

RABONI, Sonia Mara et al. **Molecular epidemiology of HIV-1 clades in Southern Brazil** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2010.

REIBERGER, Thomas et al. IP-10 correlates with hepatitis C viral load, hepatic inflammation and fibrosis and predicts hepatitis C virus relapse or non-response in HIV-HCV coinfection. **Antiviral therapy**, v. 13, n. 8, p. 969–76, 2008.

RICE, Scheel. NIH Public Access. **Nat.Med**, v. 19, n. 7, p. 837–849, 2014.

ROMERO-GÓMEZ, Manuel et al. Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. **Gastroenterology**, v. 128, n. 3, p. 636–641, 2005.

ROTMAN, Yaron; LIANG, T. Jake. Coinfection with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: virological, immunological, and clinical outcomes. **Journal of virology**, v. 83, n. 15, p. 7366–74, 2009.

RYAN, Pablo et al. Insulin Resistance Is Associated With Advanced Liver Fibrosis and High Body Mass Index in HIV/HCV-Coinfected Patients. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 50, n. 1, p. 109–110, 2009.

SAJADI, Mohammad M. et al. Chronic immune activation and decreased CD4 cell counts associated with hepatitis C infection in HIV-1 natural viral suppressors. **Aids**, v. 26, n. 15, p. 1879–1884, 2012.

SAKAMOTO, Naoya et al. ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon- α and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C. **Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology**, v. 40, n. 11, p. 1063–71, 2010.

SANDLER, Netanya G. et al. Host Response to Translocated Microbial Products Predicts Outcomes of Patients With HBV or HCV Infection. **Gastroenterology**, v. 141, n. 4, p. 1220-1230.e3, 2011.

SANTOS, JS. Indivíduos HIV-1 positivos não progressores por longo tempo - LTNP: características virais e do hospedeiro. **Tese de doutorado**, v. 91, p. 399–404, 2017.

SATTENTAU, Quentin J.; WEISS, Robin A. The CD4 antigen: Physiological ligand and HIV receptor. **Cell**, v. 52, n. 5, p. 631–633, 1988.

SHEN, T. et al. PD-1 expression on peripheral CD8+TEM/TEMRA subsets closely correlated with HCV viral load in chronic hepatitis C patients. **Virology Journal**, v. 7, p. 1–9, 2010.

SHIMODA, K. et al. Interleukin-8 and hIRH (SDF1-alpha/PBSF) mRNA expression and histological activity index in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 28, n. 1, p. 108–115, 1998.

SHIN, Eui Cheol; SUNG, Pil Soo; PARK, Su Hyung. Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 8, p. 509–523, 2016.

SHIPKOVA, M. Measurement of Erythrocyte Inosine Triphosphate Pyrophosphohydrolase (ITPA) Activity by HPLC and Correlation of ITPA Genotype-Phenotype in a Caucasian Population. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 240–247, 2005.

SHIPKOVA, Maria et al. Measurement of erythrocyte inosine triphosphate pyrophosphohydrolase (ITPA) activity by HPLC and correlation of ITPA genotype-phenotype in a Caucasian population. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 240–247, 2006.

SHMAGEL, K. V et al. Systemic inflammation and liver damage in HIV/hepatitis C virus coinfection. **HIV medicine**, v. 17, n. 8, p. 581–9, 2016.

SIEVERS, Fabian et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 539, 2011.

SINGAL, A. K.; ANAND, B. S. Management of hepatitis C virus infection in HIV/HCV co-infected patients: clinical review. **World J Gastroenterol**, v. 15, n. 30, p. 3713–3724, 2009.

SMITH, Donald B. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 318–327, 2014.

STERLING, Richard K. et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. **Hepatology**, v. 43, n. 6, p. 1317–1325, 2006.

STIKSRUD, Birgitte et al. Plasma IP-10 is increased in immunological nonresponders and associated with activated regulatory T cells and persisting low CD4 counts. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 73, n. 2, p. 138–148, 2016.

SUGANO, M. et al. Quantitation of hepatitis C viral RNA in liver and serum samples using competitive polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Pathology**, v. 48, n. 9, p. 820–825, 1995.

SULKOWSKI, M. S. et al. Hepatitis C virus infection as an opportunistic disease in persons infected with human immunodeficiency virus. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 30 Suppl 1, p. S77-84, 2000.

SUMI, Satoshi et al. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency. **Human genetics**, v. 111, n. 4–5, p. 360–7, 2002.

SUPPIAH, Vijayaprakash et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. **Nature genetics**, v. 41, n. 10, p. 1100–4, 2009.

SYEDBASHA, Mohammedyaseen; EGLI, Adrian. Interferon Lambda: Modulating immunity in infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. FEB, 2017.

TAKADA, Kensuke; JAMESON, Stephen C. Naive T cell homeostasis: From awareness of space to a sense of place. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 12, p. 823–832, 2009.

TAYLOR, Milton W. et al. Global effect of PEG-IFN-alpha and ribavirin on gene expression in PBMC in vitro. **Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 24, n. 2, p. 107–18, 2004.

TERILLI, Rebecca R.; COX, Andrea L. Immunity and Hepatitis C: A Review. **Current HIV/AIDS Reports**, v. 10, n. 1, p. 51–58, 2013.

THEA, Donald M. et al. Plasma cytokines, cytokine antagonists, and disease progression in African women infected with HIV-1. **Annals of Internal Medicine**, v. 124, n. 8, p. 757–762, 1996.

THOMAS, David L. et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 798–801, 2009. a.

THOMAS, David L. et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 798–801, 2009. b.

THOMPSON, Alexander J. et al. Variants in the ITPA gene protect against ribavirin-induced hemolytic anemia and decrease the need for ribavirin dose reduction. **Gastroenterology**, v. 139, n. 4, p. 1181–9, 2010.

THOMPSON, Alexander J. et al. Inosine triphosphatase genetic variants are protective

against anemia during antiviral therapy for HCV2/3 but do not decrease dose reductions of RBV or increase SVR. **Hepatology**, v. 53, n. 2, p. 389–395, 2011.

THOMPSON, Alexander J. et al. Genome-wide association study of interferon-related cytopenia in chronic hepatitis C patients. **Journal of Hepatology**, v. 56, n. 2, p. 313–319, 2012.

TURNER, B. G.; SUMMERS, M. F. Structural biology of HIV [Review]. **Journal of Molecular Biology**, v. 285, n. 1, p. 1–32, 1999.

VALLET-PICHARD, Anaïs et al. FIB-4: An inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. Comparison with liver biopsy and FibroTest. **Hepatology**, v. 46, n. 1, p. 32–36, 2007.

WAI, Chun Tao et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 38, n. 2, p. 518–526, 2003.

WEISS, Robin A. Thirty years on: HIV receptor gymnastics and the prevention of infection. **BMC Biology**, v. 11, 2013.

WHO. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis c infection. **Guidelines**, n. April, p. 124, 2014.

WHO. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021. **Global Hepatitis Programme Department of HIV/AIDS**, n. June, p. 56, 2016.

WHO. World Health Organization. **Global hepatitis report, 2017**. Department of HIV/AIDS. **Geneva; 2017**.

WIEST, R.; LAWSON, M.; GEUKING, M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. **Journal of Hepatology**, v. 60, n. 1, p. 197–209, 2014.

YILMAZ, Y. et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis with the aspartate transaminase to platelet ratio index (APRI): Usefulness in patients with chronic liver disease: APRI in chronic liver disease. **Hepatitis monthly**, v. 11, n. 2, p. 103–6, 2011.

YOUNAS, M. et al. Immune activation in the course of HIV-1 infection: Causes, phenotypes and persistence under therapy. **HIV Medicine**, v. 17, n. 2, p. 89–105, 2016.

ZEUZEM, S. et al. Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 16, n. 2, p. 75–90, 2009.

ZIMMERMANN, H.W. et al. Interleukin-8 Is Activated in Patients with Chronic Liver Diseases and Associated with Hepatic Macrophage Accumulation in Human Liver Fibrosis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e21381, 2011.

APÊNDICE

APÊNDICE 1- FORMULÁRIO DE PESQUISA

I – IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____ Código Identificação: _____

Local de residência: _____

Procedência: _____

Data de nascimento: ____-____-____

Raça: ()Branca ()Parda ()Negra ()Amarela ()Indígena ()Sem informação

Escolaridade: ()Nenhuma ()1 a 3 anos ()4 a 7 anos ()8 a 11 anos ()≥12 anos

()Sem informação

II - TIPO DE EXPOSIÇÃO:

Uso de Droga: ()Não ()Sim Qual: _____

()EV ()Inalação ()Outra _____ ()Sem informação

Atividade Sexual: () Sexo com homens ()Sexo com mulheres ()Homens e mulheres

()Número de parceiros: () 1 a 2 /ano () 2 a 5/ano () > 5/ano ()Sem informação

Transfusão Sanguínea: ()Não

()Sim Quando: ____-____-____

()Sem informação

Outros: Tatuagem () Não ()Sim ()Sem informação

Piercing () Não ()Sim ()Sem informação

Contato próximo com portador:

Hepatite B Sim () quem..... Não () Sem informação ()

Hepatite C Sim () quem..... Não () Sem informação ()

HIV Sim () quem..... Não () Sem informação ()

III – ABUSO DE ÁLCOOL

()Não ()Sim ()Sem informação () Duvidoso

IV – INVESTIGAÇÃO DE HEPATITE C

Anti-HCV: ()Positivo ()Negativo ()Sem informação ()Não realizado

Data: ____-____-____ ()Sem informação

PCR qualitativo HCV: ()Positivo ()Negativo ()Sem informação ()Não realizado

Data: ____-____-____

Genótipo: _____

V – INVESTIGAÇÃO DE HEPATITE B

HBsAg: ()Positivo ()Negativo ()Sem informação ()Não realizado

Data: ____-____-____

Anti-HBs: ()Positivo ()Negativo ()Sem informação ()Não realizado

Data: ____-____-____

Anti-HBc: ()Positivo ()Negativo ()Sem informação ()Não realizado

Data: ____-____-____

PCR QUANTITATIVA HBV (Anotar pré e durante tratamento)

Data: ____-____-____ Valor: _____

Data: ____-____-____ Valor: _____

VI – INVESTIGAÇÃO DE HIV

Anti-HIV triagem: ()Positivo ()Negativo ()Sem informação ()Não realizado

Data: ____-____-____

Anti-HIV confirmatório: ()Positivo ()Negativo ()Sem informação ()Não realizado

Data: ____-____-____

CD4 nadir (+ baixo): _____ células/ml Data: ____-____-____

Último CD4: _____ células/ml Data: ____-____-____

Carga viral nadir (+ baixa): _____ cópias/ml Log _____

Data: ____-____-____

Última carga viral: _____

____cópias/ml Log Data: ____

____-____-____

Subtipo de HIV: _____

Tratamento anti-retroviral:

() Não () Sim Data: ____-____-____

Terapia anti-retroviral atual:

() AZT (Zidovudina) () 3TC (lamivudina) () AZT+3TC (Biovir)

() D4T (Estavudina) () DDI (Didanosina) () ABV (Abacavir) () TFV (Tenofovir)

() FTC (entricitabina) () RTV (Ritonavir) () LPV/RTV (Lopinavir/Ritonavir)

() ATV (Atazanavir) () APV (Amprenavir) () FAPV (Fosamprenavir)

() DRV (Darunavir) () TPV (Tipranavir) EFV (Efavirenz) () NVP (Nevirapina)

() DLV (Delavirdina) () T20 (Inibidor de Fusão/Enfuvirtida)

() Ral (Raltegravir/Inibidor da Integrase) () CCR5 (Inibidor receptor/Maraviroc)

VII - ECOGRAFIA DE ABDOMEM

Data: ____-____-____ (Última realizada)

Laudo: () Sem alterações () Fígado com bordos irregulares () Veia porta aumentada (acima de 12 mmHg) () Esteatose () Ascite () Presença de Nódulos () Não realizada

VIII – BIÓPSIAS DE FÍGADO

1) Data: ____-____-____ () Não realizada

Laudo: () Normal

() Alterado.

Código: _____

Grau de Fibrose: () FO () F1 () F2 () F3 () F4

Atividade inflamatória portal (P) () O () 1 () 2 () 3 () 4

Atividade inflamatória periportal (PP) () O () 1 () 2 () 3 () 4

Atividade inflamatória lobular (PA) () O () 1 () 2 () 3 () 4

Esteatose () Sim () Não

Siderose () Sim () Não

2) Data: ____-____-____ () Não realizada

Laudo: () Normal

() Alterado.

Código: _____

Grau de Fibrose: () FO () F1 () F2 () F3 () F4

Atividade inflamatória portal () O () 1 () 2 () 3 () 4

Atividade inflamatória periportal () O () 1 () 2 () 3 () 4

Atividade inflamatória lobular () O () 1 () 2 () 3 () 4

Esteatose () Sim () Não

Siderose () Sim () Não

IX - TRATAMENTO DA HEPATITE B

() Não () Sim

Data início: ____-____-____

Droga: () Interferon convencional

() Interferon peguilado

() Lamivudina

() Tenofovir

() Outro. Qual: _____

Resposta ao tratamento Hepatite B

() Não () Sim

Última PCR quantitativa Data: ____-____-____ Valor: _____

X - TRATAMENTO DA HEPATITE C

☐ Não ☐ Sim

PCR quantitativo HCV: ☐ Positivo Carga Viral _____. Log: _____

☐ Negativo

☐ Sem informação

☐ Não realizado

Data: ____-____-____

1) Data início: ____-____-____

Droga: ☐ Interferon convencional

☐ Interferon peguilado

☐ Ribavirina

Resposta ao primeiro tratamento Hepatite C

☐ Mantém tratamento (PCR com queda de 2 log na 12ª semana ou negativo)

☐ Resposta nula (PCR sem queda de 2 log na 12ª semana)

☐ Resposta parcial (PCR negativa no final do tratamento)

☐ Resposta Viroológica Sustentada (PCR negativa até 6º mês pós tratamento)

2) Data início: ____-____-____

Droga: ☐ Interferon convencional

☐ Interferon peguilado

☐ Ribavirina

Resposta ao tratamento Hepatite C

☐ Mantém tratamento (PCR com queda de 2 log na 12ª semana ou negativo)

☐ Resposta nula

☐ Resposta parcial

☐ Resposta Viroológica Sustentada

XI- EXAMES E TRATAMENTOS COMPLEMENTARES

1) Realização do hemograma ☐ Não ☐ Sim

2) Diagnóstico de anemia ☐ Não ☐ Sim

3) Tratamento com eritropoietina ☐ Não ☐ Sim